

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **234157**
(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **410975**

(51) Int.Cl.
A23C 9/13 (2006.01)
A23C 7/04 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **16.01.2015**

(54) **Zastosowanie preparatu elagotanin z maliny właściwej *Rubus idaeus* L**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
18.07.2016 BUP 15/16

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
31.01.2020 WUP 01/20

(73) Uprawniony z patentu:
POLITECHNIKA ŁÓDZKA, Łódź, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:
ELŻBIETA KLEWICKA, Łódź, PL
ROBERT KLEWICKI, Łódź, PL
KRZYSZTOF KOŁODZIEJCZYK, Łódź, PL
LIDIA LIPIŃSKA, Chodeczek, PL
ADRIANA NOWAK, Łódź, PL
MICHAŁ SÓJKA, Andrespol, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Ewa Kaczur-Kaczyńska

PL 234157 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie preparatu elagotanin z maliny właściwej *Rubus idaeus* L.

Grzyby z rodzaju *Geotrichum*, które znalazły zastosowanie w przemyśle spożywczym i biotechnologicznym do produkcji serów dojrzewających typu Brie, Camembert, są również częstymi zanieczyszczeniami produktów fermentowanych: mlecznych i roślinnych. U ludzi grzyby te mogą wywoływać geotrichozę – zakażenie miejscowe lub rozsiane, którego najczęstszym czynnikiem etiologicznym jest gatunek *Geotrichum candidum*. Droga infekcji może być pokarmowa lub inhalacyjna poprzez inhalację zarodników czy nawet urazy tkanek (czasopismo *Postępy Mikrobiologii*, 2009, 48, 2, 125–132, czasopismo *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 126, 327–332). Szczepy grzybów *Geotrichum candidum* występują w powietrzu, glebie, wodzie, w przewodzie pokarmowym człowieka i zwierząt. *Geotrichum candidum* jest mikroorganizmem oportunistycznym, a podstawowym czynnikiem predysponującym do zakażeń jest niska odporność organizmu spowodowana chorobami współistniejącymi, takimi jak nowotwory układu krwiotwórczego, zakażenie HIV oraz dodatkowo długotrwała antybiotykoterapia. Na zakażenie podatni są również pacjenci przyjmujący kortykosteroidy oraz chorzy na cukrzycę (czasopismo *Postępy Mikrobiologii*, 2009, 48, 2, 125–132).

W artykule w czasopiśmie *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 102, 1–20 podano informację o obecności *Geotrichum candidum* w 17–40% próbek mleka krowiego, koziego, owczego, w ilości 10^2 jednostek tworzących kolonie (jtk) w 1 ml. Obecność omawianych grzybów w surowym mleku będzie powodowała obecność tych grzybów w przetworach takich jak twarogi, kwaśne mleko i innych produktach, w których wytwarzaniu nie stosuje się pasteryzacji. W przypadku kiszonek roślinnych zakażenia drożdżami z gatunków *Geotrichum candidum*, *Pichia manshurica* i *Issachenkia occidentalis* są częstą przyczyną obniżenia jakości produktu. Grzyby te utleniają kwasy organiczne odpowiedzialne za trwałość kiszonki, a w wyniku obniżenia kwasowości środowiska stwarzają dogodne warunki do rozwoju bakterii gnilnych (czasopismo *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*, 2012, 57(3), 31–36).

Elagotanimy cechują się złożoną budową chemiczną, posiadają w strukturze co najmniej jedną cząsteczkę kwasu elagowego. Występują naturalnie w niektórych owocach, orzechach, nasionach, ziołach. Bogate w elagotanimy są owoce jagodowe, zwłaszcza maliny, jeżyny, porzeczki, truskawki, a także orzechy włoskie, pistacje, orzechy nerkowca, kasztany, żołędzie oraz pikany. Szczególnie obfitującymi w elagotanimy są owoce granatu oraz winogrona (czasopismo *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50(14): 3971–3976). Mechanizmy ich aktywności biologicznej są różnorodne i obejmują właściwości antyoksydacyjne, antydrobnoustrojowe, przeciwzapalne i antynowotworowe. Elagotanimy wykazują aktywność antydrobnoustrojową wobec bakterii, grzybów, a nawet wirusów, przy czym oddziaływania antybakteryjne są dominującym rodzajem ich aktywności.

Z czasopisma *World Scientific*, 2009, 55–93 oraz z czasopisma *Plant Polyphenols*, 2000, 2: 575–594, *Springer US* wiadomo, iż elagotanimy, takie jak corilagin czy phyllanthusiin C hamują wzrost grzybów, takich jak *Candida albicans* i *Cryptococcus neoformans*, przy czym efekt ten jest porównywalny do działania tych elagotanin wobec bakterii *Staphylococcus* (MIC 125–500 µg/ml).

Dotychczas do fermentowanych napojów mlecznych klasyfikowanych od I do IV generacji stosuje się wsady owocowe oraz dodatki barwne pochodzenia naturalnego, takie jak czerwień buraczana (betalainy) E162 czy antocyjany (związki polifenolowe, na przykład z czarnej porzeczki) E163. Dodatki te mają za zadanie podnieść walory sensoryczne i organoleptyczne mlecznych produktów fermentowanych.

Zastosowanie elagotanin jako środka antydrobnoustrojowego wobec grzybów, **według wynalazku** polega na tym, że ekstrakt elagotanin z wyłoków uzyskanych w produkcji soku z maliny właściwej *Rubus idaeus* L stosuje się jako środek ograniczający wzrost grzyba *Geotrichum candidum* w fermentowanym mleku podczas przechowywania chłodniczego fermentowanego mleka, który dodaje się do mleka w takiej ilości, aby stężenie elagotanin w mleku było równe 10 mg/ml mleka przy zawartości grzyba w mleku do $1,2 \times 10^5$ jtk/ml. Ekstrakt elagotanin dodaje się do mleka przed lub po jego fermentacji.

Obecność preparatu elagotanin powoduje zahamowanie wzrostu grzyba *Geotrichum candidum* oraz obniżenie jego liczebności podczas przechowywania chłodniczego (5°C). Zastosowanie elagotanin do ograniczenia wzrostu tego grzyba zanieczyszczającego żywność mleczną, fermentowaną pozwala na otrzymanie produktów o wysokiej jakości mikrobiologicznej.

Sposób według wynalazku ilustrują poniższe przykłady.

Przykład 1

Ekstrakt elagotanin otrzymano z pozostałości tj. wyłoków uzyskanych w produkcji soku malinowego w następujący sposób. Ekstrakcję elagotanin przeprowadzono w dwóch sukcesywnych etapach za pomocą 60% acetonu w temperaturze pokojowej. Stosunek wyłoków do zastosowanego ekstrahenta wynosił 1:5, a czas ekstrakcji jednego etapu 8 godzin. Proces ekstrakcji wspomagano wytrząsaniem. Ekstrakty otrzymane w dwóch etapach połączono i przefiltrowano przez filtr celulozowy. Uzyskany w ten sposób surowy ekstrakt poddano procesowi odpędzenia w celu usunięcia acetonu, z zastosowaniem rotacyjnej wyparki próżniowej. Proces odpędu prowadzono w temperaturze 60°C, przy próżni od 45 do 7,2 kPa. Odpędzony ekstrakt poddano filtracji na filtrze celulozowym, a następnie oczyszczaniu. Proces oczyszczania przeprowadzono na kolumnie o wymiarach 90×2,6 cm wypełnionej złożem sorpcyjnym Amberlite XAD 1600N. Ekstrakt наносzono na kolumnę z prędkością ok. 15 mL/min. Następnie przeprowadzono proces elucji z prędkością około 10 mL/min, za pomocą wodno-etanolowych roztworów o stężeniu etanolu kolejno: 10%, 20%, 30%, 40%, 50% i 60%. Objętość roztworów każdego stężenia etanolu, użyta w procesie elucji była równa objętości kolumny. Najbogatszy w elagotaniny, w tym w lambertianinę C i sanguinę H-6 był eluat zbierany w trakcie nanoszenia 40% etanolu. Uzyskany w ten sposób eluat poddano procesowi odpędu etanolu, a następnie zatężania do około 5°Bx za pomocą rotacyjnej wyparki próżniowej. Proces odpędu i zatężania prowadzono w temperaturze 60°C, przy próżni od 45 do 7,2 kPa. Pozbawiony etanolu i zatężony ekstrakt zamrożono, a następnie poddano procesowi liofilizacji. Uzyskany preparat o barwie czerwonej charakteryzował się zawartością elagotanin 60%, przy czym lambertianina C i sanguina H-6 razem stanowiły ponad 90% ogółu elagotanin.

Mleko rekonstruowane 10%-owe (mleko w proszku odtłuszczone firmy BTL sp. z o.o.) pasteryzowano w temperaturze 80°C przez 10 minut. Po ochłodzeniu zaszczerpiono je bakteriami fermentacji mlekowej *Lactobacillus acidophilus* użytymi w ilości $1,5 \times 10^6$ jtk/ml i dodano roztwór wodny otrzymanego uprzednio preparatu elagotanin w takiej ilości, aby stężenie elagotanin w mleku wynosiło 10 mg/ml. Tak przygotowane mleko inkubowano 48 godzin w temperaturze 37°C. Następnie zanieczyszczono mleko grzybem *Geotrichum candidum* dodanym w ilości $1,2 \times 10^5$ jtk/ml. Otrzymane fermentowane mleko, zanieczyszczone grzybem przeniesiono w warunki chłodnicze (5°C). Podczas przechowywania w fermentowanym mleku kontrolowano liczebność grzyba *Geotrichum candidum* w czasie 2, 5, 9 i 14 dni. Równolegle wykonano próbę kontrolną mleka fermentowanego zanieczyszczonego grzybem, ale bez dodatku elagotanin.

W tabeli 1 przedstawiono liczebność grzyba *Geotrichum candidum* w mleku fermentowanym przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, w obecności preparatu elagotanin podczas przechowywania chłodniczego.

Tabela 1

Czas [doba]	Mleko fermentowane bez dodatku elagotanin	Mleko fermentowane z elagotaninami
0	$1,2 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$
2	$4,4 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$
5	$8,0 \times 10^4$	$9,8 \times 10^2$
9	$1,8 \times 10^4$	$1,6 \times 10^2$
14	$5,7 \times 10^4$	0,0

Przykład 2

Mleko rekonstruowane 10%-owe (mleko w proszku odtłuszczone firmy BTL sp. z o.o.) pasteryzowano w temperaturze 80°C przez 10 minut. Po ochłodzeniu zaszczerpiono bakteriami fermentacji mlekowej *Lactobacillus acidophilus* w ilości $1,5 \times 10^6$ jtk/ml. Tak przygotowane mleko inkubowano 48 godzin w 37°C. Następnie mleko zanieczyszczono grzybem *Geotrichum candidum* dodanym w ilości $1,2 \times 10^5$ jtk/ml i dodano roztwór wodny preparatu elagotanin otrzymanego jak w przykładzie 1 w takiej ilości, aby stężenie elagotanin w mleku wynosiło 10 mg/ml. Otrzymane fermentowane mleko z dodatkiem elagotanin przeniesiono w warunki chłodnicze (5°C). W przechowywanym fer-

mentowanym mleku kontrolowano liczebność *Geotrichum candidum* w czasie 2, 5, 9 i 14 dni. Równolegle wykonano próbę kontrolną mleka fermentowanego zanieczyszczonego grzybami ale bez dodatku elagotanin.

W tabeli 2 podano liczebność grzyba *Geotrichum candidum* w mleku fermentowanym przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus* z dodatkiem preparatu elagotanin (po fermentacji) podczas przechowywania chłodniczego.

Tabela 2

Czas [doba]	Mleko fermentowane bez dodatku elagotanin	Mleko fermentowane z dodatkiem elagotanin po fermentacji
0	$1,2 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$
2	$4,4 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$
5	$8,0 \times 10^4$	$3,0 \times 10^1$
9	$1,8 \times 10^4$	$1,2 \times 10^1$
14	$5,7 \times 10^4$	0,0

W każdym z podanych przykładów, w wyniku dodatku preparatu elagotanin do mleka fermentowanego przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, zanieczyszczonego grzybem *Geotrichum candidum* stwierdzono ograniczenie wzrostu grzybów podczas przechowywania chłodniczego. Efektywniejsze ograniczenie wzrostu i eliminację grzybów ze środowiska fermentowanego mleka uzyskano dodając preparat elagotanin do mleka fermentowanego po procesie fermentacji.

Zastrzeżenia patentowe

1. Zastosowanie elagotanin jako środka antydrobnoustrojowego wobec grzybów, **znamiennie tym**, że ekstrakt elagotanin z wyłoków uzyskanych w produkcji soku z maliny właściwej *Rubus idaeus* L stosuje się jako środek ograniczający wzrost grzyba *Geotrichum candidum* w fermentowanym mleku podczas przechowywania chłodniczego fermentowanego mleka, który dodaje się do mleka w takiej ilości, aby stężenie elagotanin w mleku było równe 10 mg/ml mleka przy zawartości grzyba w mleku do $1,2 \times 10^5$ jtk/ml.
2. Zastosowanie według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że ekstrakt elagotanin dodaje się do mleka przed lub po jego fermentacji.