

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 246673 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **444531**

(22) Data zgłoszenia: **2023.04.24**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2024.10.28 BUP 44/2024**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2025.02.24 WUP 08/2025**

(51) MKP:

A23L 2/02 (2006.01)

A23L 33/135 (2016.01)

A23L 33/14 (2016.01)

A61K 35/74 (2015.01)

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA ŁÓDZKA, Łódź, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:

WERONIKA MAJCHRZAK, Sulejów, PL

ILONA MOTYL, Bukowiec, PL

KRZYSZTOF ŚMIGIELSKI, Łódź, PL

JOANNA ORACZ, Kamieńsk, PL

WIKTORIA LISZKOWSKA, Rąbień AB, PL

MARCIN SYPKA, Łódź, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Ewa Kaczur-Kaczyńska, Łódź, PL

(54) Tytuł:

Sposób wytwarzania biofermentu z odpadów owocowych

PL 246673 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania biofermentu z odpadów owocowych, przeznaczonego do zastosowania w przemyśle spożywczym, przemyśle kosmetycznym i w suplementach diety.

Według definicji podanej w Encyklopedii MDPI, biofermenty to innowacyjne składniki ekstrahowane z naturalnych surowców, głównie z surowców roślinnych, w wyniku procesu fermentacji odpowiednimi szczepami mikroorganizmów. Ważną właściwością biofermentów jest biokompatybilność, gdyż proces fermentacji zwiększa aktywność biochemiczną i fizjologiczną substratu poprzez przekształcanie związków wielkocząsteczkowych w struktury małowcząsteczkowe i stąd surowce po procesie są bardziej dostępne i aktywne biochemicznie dla organizmów w porównaniu z surowcami niesfermentowanymi. Proces fermentacji zależy od rodzaju surowca, użytego szczepu mikroorganizmu i sposobu prowadzenia. Dobór mikroorganizmów jest istotny dla pozyskania oczekiwanej nowej matrycy związków biologicznie czynnych.

Z czasopisma *Applied Microbiology International* t. 66, wyd.2, luty 2018, s. 153–160 wiadomo, iż 2-feniloetanol (2-PE), alkohol stosowany w przemyśle kosmetycznym jako związek aromatyzujący i/lub konserwant, można otrzymać w procesie fermentacji serwatki wzbogaconej produktami ubocznymi z przetwarzania buraków cukrowych (odpowiedni poziom źródła węgla), po uzupełnieniu L-feniloalaniną. Proces fermentacji przeprowadzano na szczepach środowiskowych z gatunków: *Meyerozyma caribbica*, *Metschnikowia chrysoperlae*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Pichia fermentans* i *Saccharomyces cerevisiae*.

Z publikacji w czasopiśmie *Molecules* 2019; 24(19): 3519 jest znany proces fermentacji soku jagód goji przy użyciu mieszanek szczepów bakterii SLV (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri* i *Bacillus velezensis*), SZP (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum* i *Bacillus licheniformis*) i SZVP (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus velezensis* i *Bacillus licheniformis*).

W opisie zgłoszenia patentowego CN109757715A ujawniono proces pozyskania napoju zawierającego bioferment z prawoślazu (*Abelmoschus manihot* (L.) Medicus) oraz izomaltooligosacharydu i probiotyków (*Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium longum*). Surowiec poddano dwukrotnie procesowi fermentacji. Do pierwszego roztworu fermentacyjnego dodano oligomeryczną izomaltozę 900, probiotyki i wymieszano. Proces fermentacji prowadzono w temperaturze pokojowej przez 45–60 dni. Produktem fermentacji był bioenzym zawierający oligomeryczną izomaltozę, wzbogacony o szczepy probiotyczne, co jest korzystne dla regulacji flory jelitowej człowieka i wzmocnienia organizmu.

W opisie zgłoszenia patentowego CN107739270A opisano otrzymywanie biofermentu przy wykorzystaniu brązowego cukru, świeżych odpadów liści warzyw lub świeżej zgnilizny owoców, skórek owoców, skórek warzyw, wody do mycia ryżu i ryżu. Do wody z brązowym cukrem dodano wyszczególnione wyżej surowce i poddano fermentacji spontanicznej. Proces prowadzono przez okres 7–30 dni, w temperaturze 20–30°C. Pozyskany bioferment poprawiał wzrost roślin na obszarach skażonych ropą naftową.

Z opisu zgłoszenia patentowego CN115517361A jest znana metoda fermentacji płynnej biologicznego fermentu spożywczego i sposobu jego przygotowania. Otrzymany bioferment spożywczy to złożony preparat fermentacyjny bogaty w składniki odżywcze pochodzące z różnych owoców i warzyw – wolne aminokwasy, polipeptydy, białka, bogaty w probiotyki, enzymy bioaktywne i inne substancje bioaktywne powstające podczas procesu. Produkt ma zwiększoną bioaktywność i biokompatybilność z organizmem człowieka.

Jagoda kamczacka to roślina owocodajna, pochodząca od gatunków *Lonicera kamtschatica* oraz *Lonicera caerulea*, *Lonicera altaica*, pochodzących z Rosji oraz *Lonicera caerulea* var. *emphylocalyx* z Japonii. Owoce wyróżniają się niezwykle wysoką aktywnością przeciwutleniającą i jednocześnie wysoką koncentracją polifenoli, w tym antocyjanów. Dotychczas są spożywane w postaci surowej lub w niewielkim stopniu przetwarzane w dżemy, soki bądź nalewki alkoholowe. Główne zastosowanie to pozyskiwanie soków, gdzie produktem ubocznym są wytloki stosowane obecnie jako nawóz organiczny w rolnictwie. Wykazano, iż w wytlókach jagody kamczackiej pozostaje duża ilość polifenoli, takich jak kwas 3-O-kawoilochinowy, kwas 5-O-kawoilochinowy, kwas p-kumarowy, pochodne kwasu kawowego, kwas 3,4-di-O-kawoilochinowy. Ponadto odpady zawierają dużą ilość antocyjanów, takich jak cyjanidyno-3,5-O-diglukozyd, cyjanidyno-3-O-glukozyd, cyjanidyno 3-O-rutinozyd, peonidyno 3-O-glukozyd, a także są źródłem witamin takich jak B1, B2, B3, B6 oraz C.

Z opisu zgłoszenia patentowego P. 443438 jest znany sposób wytwarzania bioaktywnego preparatu, przeznaczonego do zastosowania w przemyśle spożywczym, przemyśle kosmetycznym i w suplementach diety, polegający na liofilizacji wyłoków z przetwórstwa owoców jagody kamczackiej, świeżych lub zamrożonych. W pierwszym etapie liofilizacji wyłoki zamraża się do temperatury -15°C , przy czym temperaturę wyłoków już zamrożonych doprowadza się najpierw do -15°C , następnie zamrożone wyłoki poddaje się działaniu obniżonego ciśnienia 0,15 Pa w temperaturze 10°C i po wyrównaniu w tych warunkach temperatury wyłoków z temperaturą otoczenia, poddaje się wyłoki suszeniu w temperaturze 30°C .

W opisie patentowym PL 242139 ujawniono zastosowanie ekstraktów z owoców jagody kamczackiej z gatunku *Lonicera caerulea* L var. *Kamtschatica*, zawierających irydoidy, antocyjany, kwasy fenolowe, flawonole, w odpowiednich stężeniach, do wytwarzania produktów farmaceutycznych obniżających poziom trójglicerydów, a także suplementu diety, środka żywieniowego lub składnika żywności obniżającego poziom trójglicerydów.

Z opisu patentowego PL 187311 jest znany preparat związków polifenolowych pochodzenia roślinnego, w którym jako jedną z substancji czynnych wykorzystuje się antocyjanozydy izolowane między innymi z owoców jagody kamczackiej, przeznaczony do wprowadzania do mieszaniny składników wyrobów kosmetycznych bądź farmaceutycznych lub wyrobów spożywczych.

Celem wynalazku jest opracowanie sposobu wytwarzania biofermentu z surowca owocowego stanowiącego odpad utylizowany dotychczas jako nawóz w rolnictwie.

Sposób wytwarzania biofermentu z odpadów owocowych, przeznaczonego do zastosowania w przemyśle spożywczym, przemyśle kosmetycznym i w suplementach diety, w drodze fermentacji z udziałem szczepów środowiskowych, **według wynalazku** polega na tym, że fermentacji poddaje się wyłoki uzyskane z przetwórstwa owoców jagody kamczackiej, świeżych lub zamrożonych do temperatury od -30°C do -70°C , przy czym surowiec poddaje się, bezpośrednio lub po rozmrożeniu, rozcieńczeniu wodą użytą w stosunku wagowym do surowca 1:1, po czym zaszczenia się rozcieńczony surowiec wyhodowanym inokulum jednego ze szczepów mikroorganizmów środowiskowych stanowiących naturalną mikroflorę stosowanych wyłoków lub mieszaniną wyhodowanych inokulów jednego ze szczepów bakterii mlekowej i jednego ze szczepów drożdży także zawartych w tej mikroflorze środowiskowej, zapewniających uzyskanie założonej zawartości określonych antocyjanin w matrycy biofermentu, stosując 1,5 ml inokulum lub inokulów o liczbie komórek 10^6 – 10^8 jtk/ml i poddaje fermentacji w temperaturze 30°C w czasie 5–6 dni, po czym otrzymany w ten sposób pre-bioferment odwirowuje się z szybkością 4200 rpm w czasie 10 minut, a uzyskany w wyniku odwirowania supernatant stanowi bioferment właściwy.

Sposobem według wynalazku uzyskuje się bioferment o znacznie większej ilości związków chemicznych i o wyższej biodostępności dla organizmu człowieka niż wyjściowa matryca, o potencjalnym zastosowaniu w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym lub kosmetycznym. Preparat otrzymany sposobem według wynalazku, w postaci płynu, charakteryzuje się zwiększoną biodostępnością oraz podwyższoną, w porównaniu z wyłokami przed fermentacją, zawartością mniejszych cząsteczek związków bioaktywnych, co jest istotne dla biodostępności składników preparatu. Wprowadzenie jednego ze szczepów lub mieszaniny szczepu bakterii i drożdży, stanowiących mikroflorę wyłoków powoduje zmianę składu w produktach bioaktywnych matrycy biofermentu, przy czym mieszanina wykazuje działanie synergiczne. Sposób według wynalazku umożliwia zagospodarowanie wyłoków z przetwórstwa owoców jagody kamczackiej, stanowiących dotychczas produkt odpadowy.

Supernatant może być stosowany w formie surowej bądź poddany procesowi liofilizacji i przechowywany w ampulkach lub w mikrokapsułkach.

Sposób według wynalazku ilustrują poniższe przykłady.

Przykład 1

75 g świeżych wyłoków uzyskanych z przetwórstwa owoców jagody kamczackiej umieszczono w zdezynfekowanej, szklanej butelce laboratoryjnej o pojemności 200 ml, z zakrętką i dodano 75 g wody o temperaturze w zakresie 25 – 30°C oraz określono pH. Za pomocą techniki MALDI-TOF MS zidentyfikowano jako szczep środowiskowy wyłoków szczep bakterii *Lactocaseibacillus paracasei* o liczbie komórek 10^8 jtk/ml. Wyhodowano inokulum tego szczepu bakterii na pożywce MRS w hodowli płynnej, po czym 1, 5 ml wyhodowanego inokulum o liczbie komórek 10^7 jtk/ml zaszczenia się przygotowaną uprzednio mieszaniną wyłoków z wodą. Zaszczenia medium umieszczono w cieplarni Memmert UF160

o temperaturze 30°C na okres 5 dni. Następnie otrzymany pre-bioferment rozlano do sterylnych probówek typu Falcon o pojemności 50 ml i umieszczono w wirówce stołowej Eppendorf™ Centrifuge 5804 R obracającej się z szybkością 4200 rpm na okres 10 minut. Otrzymany po tym czasie supernatant zlan do osadu do sterylnych probówek typu Falcon o pojemności 25 ml i określono zawartość w nim polifenoli, antocyjanin, cukrów i witamin oraz dokonano pomiaru pH.

Przykład 2

75 g rozmrożonych wyłtoków uzyskanych z przetwórstwa owoców jagody kamczackiej umieszczono w zdezynfekowanej, szklanej butelce laboratoryjnej o pojemności 200 ml, z zakrętką i dodano 75 g wody o temperaturze w zakresie 25–30°C oraz określono pH. Za pomocą techniki MALDI-TOF MS zidentyfikowano jako szczepy środowiskowe wyłtoków szczep bakterii *Lactocaseibacillus paracasei* o liczbie komórek 10^8 jtk/ml oraz szczep drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Wyhodowano inokulum tego szczepu bakterii na pożywce MRS w hodowli płynnej, zaś szczep drożdży na pożywce YPG w hodowli płynnej, po czym 0,75 ml wyhodowanego inokulum bakterii o liczbie komórek 10^7 jtk/ml oraz 0,75 ml inokulum drożdży o liczbie komórek 10^7 jtk/ml zaszczerpiono przygotowaną uprzednio mieszaninę wyłtoków z wodą. Zaszczepione medium umieszczono w cieplarni Memmert UF160 o temperaturze 30°C na okres 6 dni. Następnie otrzymany pre-bioferment rozlano do sterylnych probówek typu Falcon o pojemności 50 ml i umieszczono w wirówce stołowej Eppendorf™ Centrifuge 5804 R obracającej się z szybkością 4200 rpm na okres 10 minut. Otrzymany po tym czasie supernatant zlan do osadu do sterylnych probówek typu Falcon o pojemności 25 ml i określono zawartość w nim polifenoli, antocyjanin, cukrów i witamin oraz dokonano pomiaru pH.

Wyniki badań wyłtoków stosowanych w przykładach (jako wyłtoki 1 i wyłtoki 2) oraz biofermentów otrzymanych w przykładach (jako bioferment 1 i bioferment 2) przedstawiono w poniższych tabelach 1–5: w tabeli 1 zawartość polifenoli, w tabeli 2 zawartość antocyjanin, w tabeli 3 zawartość cukrów, w tabeli 4 zawartość witamin, zaś w tabeli 5 pH.

Tabela 1

Próba	Zawartość [mg/100 g]					
	CA	3-CQA	5-CQA	pCuA	3,4-DiCQA	CA derivative
Wyłtoki 1	nie wykazano	wykazano	wykazano	wykazano	wykazano	nie wykazano
Wyłtoki 2	nie wykazano	wykazano	wykazano	wykazano	wykazano	wykazano
Bioferment 1	wykazano	wykazano	wykazano	wykazano	wykazano	wykazano
Bioferment 2	wykazano	wykazano	wykazano	wykazano	wykazano	wykazano

W tabeli oznaczają:

CA – kwas kawowy,

3-CQA – kwas 3-O-kawoilochinowy,

5-CQA – kwas 5-O-kawoilochinowy,

pCuA – kwas p-kumarowy,

CA derivative – pochodna kwasu kofeinowego,

3,4-DiCQA – kwas 3,4-Di-O-kawoilochinowy.

Tabela 2

Próba	Zawartość [mg/100 g]			
	Cy-3,5-diglu	Cy-3-glu	Cy-3-rut	Pe-3-glu
Wytłoki 1	wykazano	wykazano	wykazano	wykazano
Wytłoki 2	wykazano	wykazano	wykazano	wykazano
Bioferment 1	nie wykazano	wykazano	nie wykazano	nie wykazano
Bioferment 2	wykazano	wykazano	wykazano	wykazano

W tabeli oznaczają:

Cy-3,5-diglu – cyjanidyno-3,5-O-diglukozyd,

Cy-3-glu – cyjanidyno-3-O-glukozyd,

Cy-3-rut – cyjanidyno-3-O-rutinozyd,

Pe-3-glu – peonidyno-3-O-glukozyd.

Tabela 3

Próba	Zawartość cukrów [g/100 g]		
	Fruktoza	Glukoza	Suma
Wytłoki 1	1,91 ± 0,50	0,84 ± 0,50	2,74 ± 0,50
Wytłoki 2	1,87 ± 0,50	1,13 ± 0,50	2,99 ± 0,50
Bioferment 1	0,02 ± 0,50	0,00	0,02 ± 0,50
Bioferment 2	0,72 ± 0,50	0,00	0,72 ± 0,50

Tabela 4

Próba	Zawartość witamin [mg/100 g]				
	Wit. C	Wit. B1	Wit. B2	Wit. B3	Wit. B6
Wytłoki 1	wykazano	wykazano	wykazano	wykazano	wykazano
Wytłoki 2	wykazano	wykazano	wykazano	wykazano	wykazano
Bioferment 1	wykazano	wykazano	wykazano	wykazano	wykazano
Bioferment 2	wykazano	wykazano	wykazano	wykazano	wykazano

Tabela 5

Próba	pH [-]
Surowiec 1 przed fermentacją	4,22 ± 1,50
Bioferment 1	4,34 ± 0,93
Surowiec 2 przed fermentacją	4,18 ± 1,50
Bioferment 2	4,25 ± 0,87

Zastrzeżenie patentowe

1. Sposób wytwarzania biofermentu z odpadów owocowych, przeznaczonego do zastosowania w przemyśle spożywczym, przemyśle kosmetycznym i w suplementach diety, w drodze fermentacji z udziałem szczepów środowiskowych, **znamienny tym**, że fermentacji poddaje się wytloki uzyskane z przetwórstwa owoców jagody kamczackiej, świeżych lub zamrożonych do temperatury od -30°C do -70°C , przy czym surowiec poddaje się, bezpośrednio lub po zamrożeniu, rozcieńczeniu wodą użytą w stosunku wagowym do surowca 1:1, po czym zaszczepla się rozcieńczony surowiec wyhodowanym inokulum jednego ze szczepów mikroorganizmów środowiskowych stanowiących naturalną mikroflorę stosowanych wytlóków lub mieszaniną wyhodowanych inokulów jednego ze szczepów bakterii mlekowej i jednego ze szczepów drożdży także zawartych w tej mikroflorze środowiskowej, zapewniających uzyskanie założonej zawartości określonych antocyjanin w matrycy biofermentu, stosując 1,5 ml inokulum lub inokulów o liczbie komórek 10^6 – 10^8 jtk/ml i poddaje fermentacji w temperaturze 30°C w czasie 5–6 dni, po czym otrzymany w ten sposób pre-bioferment odwirowuje się z szybkością 4200 rpm w czasie 10 minut, a uzyskany w wyniku odwirowania supernatant stanowi bioferment właściwy.