

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **218747**  
(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **388379**

(22) Data zgłoszenia: **24.06.2009**

(51) Int.Cl.

**A23L 1/308 (2006.01)**

**A23L 1/304 (2006.01)**

**A61K 38/16 (2006.01)**

**A61K 36/31 (2006.01)**

**A61K 36/48 (2006.01)**

**A61K 36/899 (2006.01)**

**A61P 7/06 (2006.01)**

(54) **Sposób wytwarzania kompozycji o podwyższonej zawartości ferrytyny roślinnej i innych form żelaza, kompozycja i jej zastosowanie do wytwarzania preparatu do suplementowania diety człowieka**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

**03.01.2011 BUP 01/11**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

**30.01.2015 WUP 01/15**

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet PRZYRODniczy  
W POZNANIU, Poznań, PL  
Instytut Chemii BIOORGANICZNEJ  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK, Poznań, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**MAGDALENA ZIELIŃSKA-DAWIDZIAK,  
Leszno, PL  
TOMASZ TWARDOWSKI, Kiekrz, PL**

(74) Pełnomocnik:

**recz. pat. Alicja Rumpel  
recz. pat. Dorota Rządewska  
recz. pat. Piotr Godlewski**

**PL 218747 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem zgłoszenia jest sposób wytwarzania kompozycji o podwyższonej zawartości ferrytyny roślinnej i innych form żelaza, kompozycja i jej zastosowanie do wytwarzania preparatu do suplementowania diety człowieka. Bardziej szczegółowo rozwiązanie dotyczy kompozycji do suplementowania diety człowieka w celu zapobiegania anemii wynikającej z niedoborów żelaza. Wynalazek dotyczy też sposobu wytwarzania kompozycji oraz jej zastosowania w formie wysuszonych i rozdrobnionych kielków wzbogaconych w żelazo na przykładzie kielków uzyskiwanych z roślin strączkowych, krzyżowych lub ziarniaków zbóż ze stymulowaną podczas hodowli w stresowych warunkach biosyntezy ferrytyny roślinnej jako środka dietetycznego stosowanego w celu zapobiegania rozwojowi anemii.

Wzbogacanie diety człowieka w duże ilości warzyw, owoców oraz pełnych nasion, ziaren, a także produktów powstałych na drodze ich przetwarzania wskazane jest z punktu widzenia zmniejszenia ryzyka zachorowania na wiele chorób, których rozwój związany jest m.in. z występowaniem wzrastającego poziomu wolnych rodników [1, 2]. Jednak odżywianie oparte przede wszystkim na produktach roślinnych wiąże się z dużym niebezpieczeństwem wywołania w organizmie niedoborów żelaza. Niedobory tego mikroelementu w diecie człowieka powodują liczne problemy zdrowotne i dotyczą około 3 mld ludzi, wywołując przede wszystkim anemię u kobiet, czy nieodwracalne osłabienie zdolności koncentracji i uczenia u dzieci [3]. Z kolei suplementacja diety człowieka związkami żelaza jest trudna ze względu na problemy związane z biodostępnością stosowanych dodatków, na ich interakcje ze składnikami żywności, czy wręcz skutki uboczne dla zdrowia człowieka i zwierząt [4]. Podczas rozważania możliwości zwiększania podaży żelaza w diecie należy pamiętać, że absorpcja żelaza z żywności jest bardzo niska i regulowana prawidłowym funkcjonowaniem erytrocytów w jelicie cienkim, dodatkowo dla żelaza, hemowego i niehemowego występują oddzielne drogi wchłaniania, a ilość wchłanianego żelaza zależna jest od prawidłowego zbilansowania diety. Z tego powodu zaburzenia homeostazy żelaza z pewnością należą do najczęściej występujących problemów zdrowotnych u ludzi. Obiecującym sposobem na zmniejszenie problemów związanych z małą biodostępnością żelaza w diecie człowieka i jednocześnie podniesienie wartości odżywczej wielu produktów roślinnych jest bezpośrednio zwiększenie zawartości żelaza w roślinach jadalnych. Zazwyczaj proponuje się w tym celu połączenie inżynierii genetycznej i wiedzy związanej z metodami uprawy roślin [5]. Szerokie zainteresowanie kieruje się także na wykorzystanie endogennej ferrytyny roślin strączkowych [6] lub wywołanie jej zwiększonej biosyntezy w roślinach jadalnych [7, 8, 9].

Ferrytyna jest dobrze poznany białkiem magazynującym żelazo zarówno w organizmach roślinnych, zwierzęcych, jak i w bakteriach i grzybach niższych. Wiązanie żelaza w rozpuszczalnej, bezpiecznej i dostępnej dla organizmu formie chroni komórki przed wysokim stężeniem tego metalu, jednocześnie gromadząc żelazo zgodnie z zapotrzebowaniami organizmu. Stwierdzono także, że ferrytyna pełni funkcje ochronne w odpowiedzi na stres oksydacyjny wywołany przez wolne rodniki, a także stanowi część systemów obronnych rośliny uruchamianych podczas działania stresu biotycznego. Charakterystyczną cechą ferrytyny jest zachowanie bardzo konserwatywnej struktury drugo- i czwartorzędowej w przypadku większości organizmów. Apoferrytynę, czyli otoczkę białkową (często zwaną „muszlą”) formują 12 lub 24 podjednostki polipeptydowe. Wewnątrz niej magazynowane jest trójwartościowe żelazo. Konserwatywne centrum ferroksozydazy warunkuje zdolność ferrytyny do utleniania  $Fe^{2+}$  do mniej toksycznego  $Fe^{3+}$  i wiązania go w formie wodorotlenku żelazowego w połączeniu ze zmienną ilością fosforanów [6].

Występująca w komórkach jelita cienkiego (enterocytach) apoferrytyna jest głównym regulatorem wchłaniania żelaza w jelitach i stanowi ona pewien rodzaj bloku jelitowego, chroniącego ustrój przed nadmiernym napływem żelaza. Apoferrytyna posiada wyjątkowe zdolności do wiązania żelaza - aż do 4 tys. atomów, zarówno w formie rozpuszczalnej, jak i bioprzyswajalnej.

Rzeczony rozwój badań nad ferrytyną roślinną rozpoczął się w latach 80-ych XX wieku obejmując białka izolowane z wielu organizmów roślinnych, w tym: ferrytynę z nasion grochu zwyczajnego [10], soi zwyczajnej [11], fasoli zwyczajnej [12] i kukurydzy [13], rzepaku zwyczajnego [14], rzodkiewnika [15], lucerny siewnej [16], sosny [17] i in.

Zainteresowanie ferrytyną roślinną wzrasta, od kiedy stwierdzono, że przy występujących w diecie niedoborach żelaza w formie hemowej organizm ludzki wykazuje zdolność adaptowania się do innych jego źródeł [18]. Właśnie dlatego preparaty ferrytynowe mogą odgrywać zasadniczą rolę w wytwarzaniu wzbogaconej w żelazo żywności i nutraceutyków. Stwierdzono, że żelazo w ferrytynie występuje w formie „trudno uwalnianej”, przede wszystkim ze względu na odporność białka na proteolizę,

dzięki czemu odporne jest ono na trawienie przez kwasy żołądkowe. Biodostępność żelaza ferrytynowego okazywała się jednak lepsza niż w przypadku innych, niehemowych źródeł tego pierwiastka. Istotne jest, że nie obserwowano skutków ubocznych, jakie wywołuje suplementowanie diety człowieka żelazem w formie  $\text{FeSO}_4$ , przede wszystkim brak zmian oksydacyjnych w żywności [19, 20, 21].

W związku z tym, że mechanizm wchłaniania  $\text{FeSO}_4$  z udziałem DMT1 nie ma zastosowania w odniesieniu do żelaza ferrytynowego, podejrzewa się, że niezbędne jest wystąpienie bezpośrednich oddziaływań pomiędzy ferrytyną i komórkami jelita [6].

Potwierdzono dobrą przyswajalność żelaza ferrytynowego z soi [22, 23] oraz preparatów ferrytynowych otrzymywanych z łubinu żółtego [24].

Skiełkowane nasiona roślin od lat stosowane są w żywieniu ludności Dalekiego Wschodu, ponieważ są uznanym sposobem na zwiększenie udziału podaży składników zawartych w ziarnach i nasionach roślin w diecie. Stanowią przy tym dodatkowo znakomite źródło składników o znaczeniu prozdrowotnym, w tym przeciwutleniaczy, witamin, mikroelementów i kwasów tłuszczowych z grupy omega-3. Najczęściej do produkcji kiełków używane są nasiona roślin strączkowych oraz ziarniaki niektórych zbóż i nasiona roślin krzyżowych, najpopularniejsze są kiełki sojowe stosowane jako dodatek do sałatek [25]. Soja uznawana jest za źródło wartościowego białka i innych składników żywieniowych w diecie człowieka. Zawarte w niej składniki pozwalają na obniżenie ryzyka rozwoju wielu chorób nowotworowych i chorób serca [26]. Stosowanie soi w postaci skiełkowanej jest dodatkowo niedrogą i prostą metodą pozwalającą na podniesienie jej odżywczych wartości i obniżenie zawartości lub biodostępności składników anty-żywieniowych. Kiełki soi stanowią wyśmienite źródło białka, witamin A, B, C i K oraz fosforu, miedzi, potasu, żelaza, manganu i magnezu, charakteryzują się także wysoką zawartością nienasyconych kwasów tłuszczowych. Regularne ich spożywanie ma dobroczynny wpływ na cerę, łagodzi stany nerwowe, dodaje energii i apetytu, ponadto ułatwiają obniżenie poziomu cholesterolu LDL oraz ciśnienie krwi.

Pszenica, która przede wszystkim jest podstawowym zbożem chlebowym, po skiełkowaniu staje się jednym z najbogatszych źródeł witamin A, B C i E, dużych ilości magnezu, wapnia, fosforu, żelaza, niacyny, tiaminy i kwasu pantotenowego.

Nasiona pastewnej rośliny - lucerny - po skiełkowaniu są cennym źródłem filoestrogenów oraz witaminy B12 i lecytyny. Uważa się także, że zapobiegają powstawaniu niektórych odmian nowotworów.

Poprzez odpowiedni dobór warunków kiełkowania nasion i ziarniaków możliwe jest jednoczesne wywołanie wystąpienia mechanizmów obronnych, warunkujących pojawienie się pożądaných różnic w składzie otrzymywanych kiełków. Formą odpowiedzi na określone warunki kiełkowania rośliny są zmiany w zachodzących procesach biosyntezy białek. Podejmowano wcześniej próby prowadzące do zwiększenia zawartości żelaza w roślinach wzrastających w podłożach bogatych w jony  $\text{Fe}^{2+}$ . Metoda została jednak zarzucona ze względu na koszt takich upraw i niekontrolowane rozmieszczenie żelaza w różnych, niekoniecznie cennych z punktu widzenia przyszłego konsumenta, fragmentach rośliny.

Biosynteza ferrytyny jest regulowana u roślin na poziomie transkrypcji w zależności od ilości wewnątrzkomórkowego żelaza. W wyniku wystąpienia w środowisku hodowlanym kontrolowanego stresu abiotycznego, przy odpowiednio dobranym poziomie występowania czynnika stresowego, jakim jest nadmiar jonów żelaza, w roślinie następuje biosynteza ferrytyny w formie kompleksu żelazo-proteinowego, który ma na celu detoksykację komórek. Żelazo zamknięte w muszli białkowej jest jednocześnie niedostępne dla takich czynników kompleksujących jak taniny, fitiny czy szczawiany. W zgłoszeniu patentowym W09846775 (opublikowanym 22-10-1998) przedstawiono rozwiązanie dotyczące roślin transgenicznych, ich części oraz komórek roślinnych, w których dochodzi do nadprodukcji białka wiążącego żelazo (ferrytyny), posiadającego jednocześnie podwyższoną odporność na abiotyczne i biotyczne stresowe warunki utleniające.

W opisie patentowym CN1257931 (opublikowanym 28-06-2000) opisano rozwiązanie, w którym ferrytyna uzupełnia niedobór żelaza w organizmie ludzkim, a także proces przygotowania tego preparatu i jego zastosowanie. Preparat ferrytyny jest przygotowany przy zastosowaniu kultury inżynierowanych bakterii o wysokiej gęstości, wytwarzających ferrytynę. Pożywka stosowana do otrzymania inżynierowanych bakterii o wysokiej gęstości zawierała węglan amonu (5 g/L), kwaśny fosforan dwupotasowy (6 g/L), dwuwodniony fosforan potasu (3 g/L), siarczan magnezu (1,5 g/L), trypton (10 - 20 g/L), ekstrakt drożdżowy (2-10 g/L), glukozę (80 - 100 g/L) i śladowe ilości Cu, Co, Ca, Zn, Mo i Mn (w ilości pomiędzy  $10^{-4}$  -  $10^{-5}$  g/L każdego z nich).

W opisie patentowym US6017713 (opublikowanym 21-01-1999) przedstawiono rozwiązanie układu *in vitro*, umożliwiającego dostosowanie biodostępnego żelaza w produktach żywieniowych.

Układ ten wykorzystuje tworzenie ferrytyny w nabłonkowych komórkach jelitowych, jako wskaźnik przyjęcia żelaza z trawionego pokarmu. W opisie patentowym US6011000 (opublikowanym 04-01-2000) opisano kompozycje farmaceutyczne zawierające związki chemiczne oraz kompozycje zawierające czynnik żelazowy stymulujący ekspresję hemoglobiny lub białka globiny, przy chorobach układu krwionośnego.

W opisie patentowym KR 20040097618 (opublikowanym 18-11-2004) przedstawiono transgeniczny ryż z genem ferrytyny o zredukowanym okresie rozrodczym i akumulującym duże ilości żelaza związanego w formie ferrytyny. Ryż może być przydatny w produkcji naturalnej żywności jako źródła żelaza dla noworodków oraz kobiet w ciąży.

W opisie patentowym KR 20040087539 (opublikowanym 14-10-2004) opisano sposób produkcji heteroplimerycznej ferrytyny. Heteroplimeryczna ferrytyna magazynuje duże ilości żelaza o dużej biodostępności, tak, że może być ona dodawana do jedzenia, paszy lub leków w celu zapobiegania oraz leczenia chorób związanych z niedoborami żelaza. W opisie patentowym KR 20040083887 (opublikowanym 06-10-2004) opisano wektor do ekspresji heteropolimeru ferrytyny drożdży i transformowany rekombinant drożdży z wektorem ekspresyjnym, oraz ekspresję heteropolimeru ferrytyny mającą na celu akumulowanie dużych ilości żelaza w komórce.

W opisie patentowym US6017713 (opublikowanym 25-01-2000) opisano system *in vitro* zdolny do efektywnego przewidywania dostępności żelaza (Fe) w żywności. W systemie zastosowano różne formy ferrytyny w nabłonkowych komórkach jelita jako wskaźnika wchłaniania Fe podczas trawienia żołądkowego i jelitowego.

W opisie patentowym US2003008042 (opublikowanym 09-01-2003) opisano kombinację żywności oraz zestawu nutraceutyków, która zapewnia łatwy i wygodny dostęp do produktów spożywczych oraz co najmniej jednego nutraceutyku. Opakowanie zawiera dwie części, które oddzielają i zabezpieczają produkt spożywczy od nutraceutyku zapewniając stabilne środowisko, zabezpieczające przed wymieszaniem produktów. Nutraceutyk może być pakowany z produktem spożywczym, możliwych jest także kilka nutraceutyków opakowanych z produktem spożywczym, kolejną możliwością jest umieszczenie nutraceutyku i produktów spożywczych na tacy w dwóch porcjach.

Korzystnie, gdy produktem spożywczym jest produkt na bazie owoców, może jednak przyjmować inne formy. Nutraceutykiem zaś może być ciało stałe, tabletki lub kapsułki bądź forma płynna.

Pomimo opisanych powyżej badań poświęconych ograniczeniu występowania niedoborów żelaza w organizmie człowieka istnieje ciągle potrzeba uzyskania skutecznych metod wprowadzenia do diety całych fragmentów roślin wzbogacanych w żelazo zapobiegając tym samym niedoborowi tego pierwiastka w organizmie.

Celem niniejszego wynalazku jest uzyskanie kompozycji o podwyższonej zawartości ferrytyny roślinnej i innych form żelaza, otrzymywanej na drodze kiełkowania soi i innych roślin w hodowlach hydroponicznych w roztworach o podwyższonym stężeniu żelaza. Wprowadzenie do diety całych fragmentów roślin wzbogacanych w żelazo poprzez kontrolowaną hodowlę w warunkach silnego stresu abiotycznego z jednej strony pozwala na bezpośrednie wprowadzenie proponowanego produktu do diety człowieka, z pominięciem żmudnej procedury przygotowywania izolatów białkowych; z drugiej strony propozycja przetworzenia kiełków w formę wysuszonej i sproszkowanej kompozycji ułatwia przechowywanie i dozowanie proponowanego produktu; dodatkowo przygotowany preparat zawiera mieszaninę związków żelaza (związanych jonowo w ferrytynie oraz w postaci soli organicznych i nieorganicznych), wraz z innymi składnikami tkanki roślinnej (innymi białkami, w tym enzymatycznymi, sacharydami, witaminami, w tym witaminą C, błonnikiem pokarmowym, przeciwutleniaczami), w związku z czym można oczekiwać dodatkowych, synergistycznych efektów korzystnych dla zdrowia człowieka. Nieoczekiwanie realizacja tak określonego celu i rozwiązanie opisanych w stanie techniki problemów związanych z otrzymywaniem preparatów wysuszonych i rozdrobnionych kiełków wzbogacanych w żelazo ze stymulowaną podczas hodowli w stresowych warunkach biosyntezą ferrytyny roślinnej jako środka dietetycznego stosowanego w celu zapobiegania rozwojowi anemii zostały osiągnięte w niniejszym wynalazku.

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania kompozycji o podwyższonej zawartości ferrytyny roślinnej i innych form żelaza, charakteryzujący się tym, że kiełki roślinne uprawia się w hodowli hydroponicznej w warunkach stresu abiotycznego wywołanego przez wprowadzenie do podłoża  $\text{FeSO}_4$  o stężeniu w przedziale 1-40 mM oraz, że następuje intensywna nadprodukcja ferrytyny magazynującej żelazo, przy czym sposób obejmuje następujące etapy:

a) odkażane nasiona lub ziarniaki roślin zalewa się wodnym roztworem o stężeniu w przedziale 1-40 mM, korzystnie 4-35 mM  $\text{FeSO}_4$  zawierającym dodatkowo jony  $\text{Mg}^{2+}$  i  $\text{Ca}^{2+}$  i pozostawia się w temperaturze pokojowej na co najmniej 2 godziny do napęcznienia;

b) spęczniałe nasiona lub ziarniaki kiełkuje się w temperaturze pokojowej i od następnego dnia podlewa się roztworem  $\text{FeSO}_4$  o stężeniu w przedziale 1 - 40 mM, korzystnie od 4 - 35 mM, przez co najmniej 3 dni, korzystnie 4-7 dni;

c) nasiona lub ziarniaki razem z kiełkami odkaża się;

d) nasiona lub ziarniaki poddaje się procesowi odkiełkowania lub pozostawia wraz z nasionami czy ziarniakami;

e) przeprowadza się proces suszenia do uzyskania wilgotności co najwyżej 14%, korzystnie 2 - 14%;

f) wysuszone kiełki lub nasiona/ziarniaki wraz z kiełkami rozdrabnia się metodą mielenia i przechowuje się w szczelnie zamkniętych opakowaniach.

Korzystnie sposób charakteryzuje się tym, że kiełki roślinne stanowią kiełki roślin strączkowych, krzyżowych lub ziarniaków zbóż, korzystnie roślin strączkowych, wzrastających w hodowlach hydroponicznych w warunkach stresu abiotycznego. Kolejnym przedmiotem wynalazku jest kompozycja o podwyższonej zawartości ferrytyny roślinnej i innych form żelaza zawierająca rozdrobnione fragmenty roślin: kiełki roślinne wraz z ziarniakami bądź nasionami, albo oddzielone kiełki roślinne, charakteryzująca się tym, że kiełki lub ziarniaki wraz z kiełkami otrzymywane są sposobem opisanym powyżej, a kompozycja zawiera dodatkowo mieszaninę związków żelaza, wraz z innymi składnikami tkanki roślinnej, przy czym zawartość żelaza jest podwyższona co najmniej 10-krotnie w zależności od gatunku rośliny i stosowanego podczas hodowli stężenia  $\text{FeSO}_4$ , w porównaniu z roślinami niepotraktowanymi  $\text{FeSO}_4$ , zaś związanemu w różnych formach przez rośliny żelazu towarzyszą substancje osłaniające komórki przed jego toksycznym działaniem, czyli naturalne przeciwutleniacze, w tym tokochromanole, karoten i witaminę C.

Korzystnie kompozycja otrzymywana jest ze skiełkowanych nasion roślin strączkowych, krzyżowych lub ziarniaków zbóż, korzystnie z nasion roślin strączkowych, wzrastających w hodowlach hydroponicznych w warunkach stresu abiotycznego.

Korzystnie kompozycja stanowi uniwersalny dodatek do żywności specjalnego przeznaczenia lub nutraceutyk.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest zastosowanie kompozycji opisanej powyżej do wytwarzania preparatu do suplementowania diety człowieka w celu zapobiegania rozwojowi anemii wynikającej z niedoborów żelaza.

Korzystnie preparat stanowi uniwersalny dodatek do żywności specjalnego przeznaczenia i/lub nutraceutyk.

Korzystnie zastosowanie ma miejsce w żywności ekstrudowanej i innych produktach przetwórstwa zbóż, przemyśle koncentratów spożywczych, korzystnie do zup oraz sosów w proszku, mieszanek i koncentratów przypraw oraz w przemyśle owocowo-warzywnym, korzystnie do soków przecierowych.

Rozwiązanie według wynalazku zostało przedstawione, w przykładach wykonania, objaśnionych w oparciu o rysunek, na którym:

figura 1 przedstawia całkowitą zawartość żelaza oznaczoną w nasionach lucerny (L), soi (S) oraz ziarniakach pszenicy (P) oraz po ich skiełkowaniu w hodowli hydroponicznej w wodzie destylowanej oraz w obecności 15 mM  $\text{FeSO}_4$ ;

figura 2 przedstawia zawartość żelaza (II) oznaczoną w nasionach lucerny (L), soi (S) oraz ziarniakach pszenicy oraz po ich skiełkowaniu w hodowli hydroponicznej w wodzie destylowanej oraz w obecności 15 mM  $\text{FeSO}_4$ ;

figura 3 przedstawia zawartość żelaza (III) oznaczoną w nasionach lucerny (L), soi (S) oraz ziarniakach pszenicy oraz po ich skiełkowaniu w hodowli hydroponicznej w wodzie destylowanej oraz w obecności 15 mM  $\text{FeSO}_4$ ;

figura 4 przedstawia zawartość skrobi w nasionach lucerny (L), soi (S) oraz ziarniakach pszenicy oraz po ich skiełkowaniu w hodowli hydroponicznej w wodzie destylowanej i w obecności 15 mM  $\text{FeSO}_4$ ;

figura 5 przedstawia zawartość cukrów redukujących w nasionach lucerny (L), soi (S) oraz ziarniakach pszenicy oraz po ich skiełkowaniu w hodowli hydroponicznej w wodzie destylowanej i w obecności 15 mM  $\text{FeSO}_4$ ;

figura 6 przedstawia aktywność amylolityczną w ekstraktach otrzymywanych z nasion lucerny (L), soi (S) oraz ziarniaków pszenicy oraz ich skielkowanych form po hodowli hydroponicznej w wodzie destylowanej i w obecności 15 mM FeSO<sub>4</sub>;

figura 7 przedstawia zawartość azotu ogólnego w nasionach lucerny (L), soi (S) oraz ziarniakach pszenicy oraz po ich skielkowaniu w hodowli hydroponicznej w wodzie destylowanej i w obecności 15 mM FeSO<sub>4</sub>;

figura 8 przedstawia zawartość białka wyekstrahowanego z nasion lucerny (L), soi (S) oraz ziarniaków pszenicy oraz z ich skielkowanych form po hodowli hydroponicznej w wodzie destylowanej i w obecności 15 mM FeSO<sub>4</sub>;

figura 9 przedstawia ziarniaki pszenicy skielkowane w 15 mM FeSO<sub>4</sub> (A1) oraz otrzymaną z nich mąkę (A2) w porównaniu do kielków hodowanych w wodzie (B1) i otrzymanej z nich mąki (B2).

Poniżej zaprezentowano przykładową realizację zdefiniowanego powyżej wynalazku.

#### P r z y k ł a d y

Rozwiązanie według wynalazku umożliwia wprowadzenie do żywienia człowieka i zwierząt spreparowanych kielków, w których podczas hodowli hydroponicznej doprowadzono do intensywnej nadprodukcji ferrytyny magazynującej znaczne ilości żelaza na skutek wywołania stresu abiotycznego.

#### Sposób otrzymywania powyższej kompozycji:

1. Odkążone (w tym przypadku za pomocą 70% etanolu) nasiona soi zalewano wodnym roztworem 4-35 mM FeSO<sub>4</sub> zawierającym dodatkowo jony Mg<sup>2+</sup> i Ca<sup>2+</sup> i pozostawiano w temperaturze pokojowej na 4-12 godzin do napęcznienia.

2. Spęczniałe nasiona soi umieszczane były w kielkownicach, w temperaturze pokojowej i od następnego dnia podlewano je 4-35 mM FeSO<sub>4</sub> roztworem FeSO<sub>4</sub>, przez kolejnych 4-5 dni.

3. Nasiona lub ziarniaki razem z kielkami odkążano przez przemywanie 70% etanolem.

4. Nasiona lub ziarniaki wraz z kielkami lub kielki po odkielkowaniu poddawano procesowi suszenia, aż do uzyskania wilgotności poniżej 14%.

5. Wyszuszone kielki lub nasiona/ziarniaki wraz z kielkami rozdrabniano metodą mielenia i przechowywano w szczelnie zamkniętych opakowaniach.

Otrzymana w ten sposób sproszkowana kompozycja [27] charakteryzowała się podwyższoną zawartością żelaza (od 10- do ponad 380-krotnie, w zależności od gatunku rośliny i stosowanego stężenia FeSO<sub>4</sub>) (por. tab. 1-3), występującego w mieszaninie związków białkowych oraz organicznych i nieorganicznych soli.

Tabela 1 przedstawia średnią zawartość żelaza w materiale (±SD), otrzymanym po hydroponicznej hodowli soi w roztworach FeSO<sub>4</sub> (0-25 mM) oznaczona metodą ASA (dla żelaza całkowitego) oraz metodą rodankową i ferozynową w ekstraktach (dla żelaza Fe<sup>3+</sup>), w porównaniu do zawartości żelaza w nasionach soi.

Tabela 2 przedstawia średnią zawartość żelaza w materiale (±SD), otrzymanym po hydroponicznej hodowli lucerny w roztworach FeSO<sub>4</sub> (0-25 mM) oznaczona metodą ASA (dla żelaza całkowitego) oraz metodą rodankową i ferozynową w ekstraktach (dla żelaza Fe<sup>3+</sup>), w porównaniu do zawartości żelaza w nasionach lucerny.

Tabela 3 przedstawia średnią zawartość żelaza w materiale (+SD), otrzymanym po hydroponicznej hodowli pszenicy w roztworach FeSO<sub>4</sub> (0-15 mM) oznaczona metodą ASA (dla żelaza całkowitego) oraz metodą rodankową i ferozynową w ekstraktach (dla żelaza Fe<sup>3+</sup>), w porównaniu do zawartości żelaza w nasionach pszenicy.

T a b e l a 1

Soja odm. Naviko	Stężenie FeSO <sub>4</sub> zastosowane do hodowli	Całkowita zawartość żelaza [mg/100 g s.S.]	Zawartość żelaza 3+ związanego w formie jonowej [mg/100 g s.S.]
1	2	3	4
nasiona	-	11,29±0,71	5,3710,01
nasiona wraz z kielkami	0	11,07±1,00	4.2810,02
	5	133,40±9,99	5,41±0,01

Ciąg dalszy tabeli 1

1	2	3	4
	10	193,12±10,34	7,55±0,01
	15	199,27±11,67	11,91±0,02
	20	311,56±11,4	70,54±0,14
	25	276,08±17,76	18,82±0,01
oddzielone kielki	0	10,14±5,73	4,82±0,02
	5	95,51±0,83	47,63±0,04
	10	376,24±3,73	56,55±0,10
	15	611,27±1,84	219,49±0,01
	20	462,82±2,62	220,95±0,05
	25	741,15±2,82	266,61±0,04

Tabela 2

Lucerna odm. Tula	Stężenie FeSO <sub>4</sub> zastosowane do hodowli	Całkowita zawartość żelaza [mg/100 g s.S.]	Zawartość żelaza 3+ związanego w formie jonowej [mg/100 g s.S.]
nasiona	-	7,17±0,00	0,96819±0,03
nasiona wraz z kielkami	0	14,41777±0,00	1,00478±10,01
	5	395,1781±0,37	54,77±0,14
	10	481,5843±0,10	63,87±0,09
	15	631,3013±0,05	119,18±0,09
	20	897,8216±0,11	204,45±0,04

Tabela 3.

Pszenvica odm. Bombona	Stężenie FeSO <sub>4</sub> zastosowane do hodowli	Całkowita zawartość żelaza [mg/100 g s.S.]	Zawartość żelaza 3+ związanego w formie jonowej [mg/100 g s.S.]
ziarniaki	-	5,6313,09	0,54±0,11
ziarniaki wraz z kielkami	0	6,4415,52	0,20±0,05
	1	20,7418,63	10,95±0,01
	2	36,3716,57	21,65±0,17
	3	83,9816,28	43,23±0,36
	4	115,9219,81	16,80±0,23
	5	99,2811,57	16,38±0,02
	10	246,4912,64	18,05±0,06
	15	254,3011,7	17,5±0,02

Pod pojęciem sproszkowanej kompozycji (proszek) rozumiemy tu zmielone kielki roślinne wraz z ziarniakami albo nasionami lub oddzielone kielki roślinne, wzbogacone podczas hodowli w żelazo, przeznaczone do stosowania jako uniwersalny dodatek do żywności specjalnego przeznaczenia lub nutraceutyk. Proponowane możliwości zastosowania obejmują produkcję żywności ekstrudowanej

oraz inne produkty przetwórstwa zbóż (makarony, wyroby piekarnicze i cukiernicze), przemysłu koncentratów spożywczych (zupy oraz sosy w proszku, mieszanki i koncentraty przypraw), przemysłu owocowo-warzywnego (warzywne i owocowo-warzywne soki przecierowe) oraz innych gałęzi przemysłu spożywczego.

Zmiany w składzie chemicznym, jakie zaobserwowano po otrzymaniu zgodnie z przedstawioną powyżej procedurą proszku w stosunku do składu ziarniaków lub nasion roślin prezentują figury 1-8 oraz tab. 4.

Figura 1 ilustruje zmiany w zawartości żelaza oznaczanego metodą płomieniowej absorpcyjnej spektrometrii atomowej, przy długości fali 248,3 nm i szerokości szczeliny 0,15 nm. Natomiast zawartość żelaza na +2 i +3 stopniu utlenienia, oznaczona metodą ferrozynową [28] w ekstraktach buforem Tris-HCl (50 mM, pH 8,0) przedstawiono na figurze 2 i 3. Wyznaczona zawartość Fe (II) i Fe (III), potwierdzona w analizach wykonanych metodą rodankową [29] świadczą o wiązaniu żelaza przez komórkę w różnych formach, w tym w postaci trwale związanej z substancjami organicznymi (żelaza schelatowanego), w postaci ferrytyny (na +3 stopniu utlenienia) i in. (soli organicznych i nieorganicznych). Uważa się przy tym, że u roślin strączkowych żelazo kumulowane jest w znaczącej większości w postaci ferrytyny [6]. Należy przy tym podkreślić, że oznaczona zawartość żelaza (III) świadczy o zawartości żelaza związanego w formie jonowej, a więc w ferrytynie i stanowi, w zależności od gatunku i odmiany rośliny oraz zastosowanego stężenia żelaza podczas hodowli kielków od 4-48% całkowitego żelaza związanego przez roślinę. Kolejne figury ilustrują zmiany, jakie stwierdzono w zawartości skrobi i cukrów redukujących oznaczanych metodą enzymatyczną (fig. 4 i 5) [30]. Aktywność amylolityczną w pH 5,5 badano w ekstraktach wykorzystując metodę z kwasem 3,5-dinitrosalicylowym, wykrywającej cukry redukujące po rozkładzie skrobi w 35°C (fig. 6) [31]. Zmiany w zawartości azotu ogólnego oznaczanego metodą Kiejdahla zaprezentowano na fig. 7 [32]. W otrzymanych ekstraktach oceniano również zawartość białka metodą Lowry'ego. Rezultaty przedstawia figura 8 [33]. Zmiany w zawartości przeciwutleniaczy (tokochromanoli:  $\alpha$ -T,  $\beta$ -T,  $\gamma$ -T,  $\beta$ -T3,  $\gamma$ -T3,  $\delta$ -T oraz  $\beta$ -karotenu) oznaczanych metodą HPLC w kompozycjach otrzymywanych po kiełkowaniu w omawianych warunkach nasion soi, po przechowywaniu kompozycji przez 12 miesięcy w szczelnie zamkniętych szklanych naczyniach, w temperaturze pokojowej, przedstawiono w tabeli 4. Tabela 4 przedstawia zawartość wybranych przeciwutleniaczy, tj. sumy tokochromanoli ( $\alpha$ -T,  $\beta$ -T,  $\gamma$ -T,  $\beta$ -T3,  $\gamma$ -T3,  $\delta$ -T) oraz karotenu w nasionach soi oraz kielkach sojowych wzrastających w medium hodowlanym zawierającym  $\text{FeSO}_4$  w stężeniach 0-20 mM, suszonych po hodowli metodą owiewową i przechowywanych przez 12 miesięcy.

Tabela 4

próbka	medium hodowlane	suma tokochromanoli [mg/100 g s.S.]	$\beta$ -karoten [mg/100 g s.S.]
nasiona soi	-	55,15	0,07
skielkowane nasiona soi	H <sub>2</sub> O	36,13	0,83
	5 mM FeSO <sub>4</sub>	50,80	0,85
	10 mM FeSO <sub>4</sub>	51,43	2,07
	15mM FeSO <sub>4</sub>	48,92	0,4
	20 mM FeSO <sub>4</sub>	45,28	0,19

Na figurze 9 przedstawiono wysuszone kielki pszenicy oraz otrzymany z nich proszek, po tradycyjnej hodowli oraz metodą zmodyfikowaną, stanowiącą podstawę do niniejszego zgłoszenia.



## Literatura

1. Lawrence J, Machljin PhD (1995) Critical assessment of the epidemiological data concerning the impact of antioxidant nutrients and cardiovascular disease. *Crit Rev Food Sei Nutr* 35:41-50
2. Cadenas E, Packer L (2002) *Handbook of antioxidants*. New York: Marcel Dekker
3. World Health Organization, WHO 2001
4. King JC (2002) Evaluating the impact of plant biofortification on human nutrition. *J Nutr* 132, 511-513
5. Grusak MA i Della Penna D (1999) Improving the nutrient composition of plants to enhance human nutrition and health. *Ann Rev Plant Physiol* 50:133-161
6. Theil EC (2004) Iron, ferritin and nutrition. *Annu Rev Nutr* 24: 327-343
7. Goto F, Yoshihara T, Shigemoto N, Toki S, Takaiwa F (1999): Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. *Nature Biotechnol.*, 17(3): 282-286;
8. Lucca P, Hurrell R, Potrykus I (2001): Genetic engineering approaches to improve the bioavailability and the level of iron in rice rains. *Theor. Appl. Genet.*, 102: 392-397;
9. Drakakaki G, Marcel S, Raymond PG, Elizabeth KL, Fisher R, Chrostou P, Stager E (2005) Endosperm-specific co-expression of recombinant soybean ferritin and *Aspergillus* phytase in maize results in increases in the levels of bioavailable iron. *Plant Mol Biol*, 59: 869-880
10. Lobreaux S, Yewdall SJ, Briat JF, Harrison PM (1992): Amino-acids sequence and predicted three-dimensional structure of pea seed (*Pisum sativum*) ferritin. *Biochem. J.*, 288: 931-939
11. Ragland M, Briat JF, Gagnon J, Laulhere JP, Massenet O, Theil EC (1990): Evidence for conservation of ferritin sequences among plants and animals and for transit peptide in soybean. *J. Biol. Chem.*, 265, 18339-18344
12. Spence MI, Henzl MT, Lammers PJ (1991): The structure of a *Phaseolus vulgaris* cDNA encoding the iron storage protein ferritin. *Plant Molec. Biol.*, 17(3): 499-504
13. Lobreaux S, Massenet O, Briat JF (1992): Iron induces ferritin synthesis in maize plantlets. *Plant Molec. Biol*, 19: 563-575
14. Buchanan-Wollaston V, Ainsworth C (1997) Leaf senescence in *Brassica napus*/ cloning of senescence related genes by subtractive hybridisation. *Plant Mol Biol*, 33: 821-834
15. Gaymard F, Boucherez J, Briat JF (1996) Characterization of a ferritin mRNA from *Arabidopsis thaliana* accumulated in response to iron through an oxidative pathway independent of abscisic acid. *Biochem J*, 318: 67-73
16. Barceló F, Miralles F, Otero Areán C (1997): Purification and characterization of ferritin from alfalfa seeds. *J. Inorg. Biochem.*, 66: 23-27
17. Li (1998) Compression stress responsive expression of ferritin. *Plant Physiol* 116: 1604-1605
18. Hunt JR, Roughead ZK (2000): Adaptation of iron absorption in men consuming diets with high or low iron bioavailability. *Am J Clin Nutr* 71(1): 94-102
19. Bard JL, Connor JR (2003) Iron status and neutral functioning. *Annu Rev Nutr* 23: 41-58;
20. Murray-Kolb LE, Welch R, Theil EC, Beard JL, (2003) Women with low iron stores absorb iron from soybeans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 77(1): 180-184;
11. Lönnerdal B (2003) Genetically modified plants for improvement trace element nutrition. *J Nutr.*, 133:1490-1493
22. Beard JL, Burton JW., Theil EC (1996) Purified ferritin and soybean meal can be sources of iron for treating iron deficiency in rats. *J Nutr* 126:154-160;
23. Theil EC, Burton JW, Beard JL (1997) A sustainable solution for dietary iron deficiency through plant biotechnology and breeding to increase seed ferritin content. *Eur J Clin Nutr* 51: S28-31
24. Twardówki T., Smól J. (2004) Zastosowanie ferrytyny roślinnej, środek farmaceutyczny, środek dietetyczny. *Biuletyn Urzędu Patentowego* 14(797)
25. Kozłowska H, Troszyńska A, Zieliński H, Buciński A, Lamparski G (2002) Wykorzystanie nasion rzepaku do produkcji kiełków jadalnych. *Rośliny Oleiste*, 23(1): 165-174
26. Wang C, Nixon R (1999) Phytochemicals in soybeans - their potential health benefits. *Inform* 10(4):315-321
27. [Zieliński H (2003) Contribution of Low Molecular Weight Antioxidants to the Antioxidant Screen of Germinated Soybean Seeds. *Plant Foods Hum Nutr* 58: 1-20
28. Stookey LL (1970) Ferrozine-a new spectrophotometry reagent for iron. *Anal Chem*, 42 (7): 779-781

29. Marczenko Z (1968) *Kolorymetryczne oznaczanie pierwiastków*, Wyd. Naukowo-Techniczne; Warszawa
30. Holm J, Björch I, Drews A, Asp NG (1986) *A rapid method for the analysis of starch*. *Stärke* 38: 224-226
31. Bernfeld O (1955) *Amylases, alpha and beta*. W: *Methods in Enzymology (I)*. S. O. Colowick 25 and NO. Kaplan, eds. Academic Press, New York, 1:149-158
32. AOAC(1990)
33. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr JL, Randall RJ (1951) *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.

## Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania kompozycji o podwyższonej zawartości ferrytyny roślinnej i innych form żelaza, **znamienny tym**, że kielki roślinne uprawia się w hodowli hydroponicznej w warunkach stresu abiotycznego wywołanego przez wprowadzenie do podłoża FeSO<sub>4</sub> o stężeniu w przedziale 1-40 mM oraz, że następuje intensywne nadprodukcja ferrytyny magazynującej żelazo, przy czym sposób obejmuje następujące etapy:

a) odkażane nasiona lub ziarniaki roślin zalewa się wodnym roztworem o stężeniu w przedziale 1-40 mM, korzystnie 4-35 mM FeSO<sub>4</sub>, który może zawierać dodatkowo jony Mg<sup>2+</sup> i Ca<sup>2+</sup> i pozostawia się w temperaturze pokojowej na co najmniej 2 godziny do napęcznienia;

b) spęczniałe nasiona lub ziarniaki kielkuje się w temperaturze pokojowej i od następnego dnia podlewa się roztworem FeSO<sub>4</sub> o stężeniu w przedziale 1 - 40 mM, korzystnie od 4 - 35 mM, przez co najmniej 3 dni, korzystnie 4 - 7 dni;

c) nasiona lub ziarniaki razem z kielkami odkaża się;

d) nasiona lub ziarniaki poddaje się procesowi odkielkowania lub pozostawia wraz z nasionami czy ziarniakami;

e) przeprowadza się proces suszenia do uzyskania wilgotności co najwyżej 14%, korzystnie 2 - 14%;

f) wysuszone kielki lub nasiona/ziarniaki wraz z kielkami rozdrabnia się i przechowuje się w szczelnie zamkniętych opakowaniach.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że kielki roślinne stanowią skielkowane nasiona lub ziarniaki roślin strączkowych, krzyżowych lub ziarniaków zbóż, podkielkowane albo wraz z ziarniakami.

3. Kompozycja o podwyższonej zawartości ferrytyny roślinnej i innych form żelaza zawierająca rozdrobnione fragmenty roślin: kielki roślinne wraz z ziarniakami bądź nasionami, albo oddzielone kielki roślinne, **znamienna tym**, że kielki lub ziarniaki wraz z kielkami otrzymywane są sposobem określonym w zastrzeżeniu 1, a kompozycja zawiera dodatkowo mieszaninę związków żelaza, wraz z innymi składnikami tkanki roślinnej, przy czym zawartość żelaza jest podwyższona co najmniej 10-krotnie w zależności od gatunku rośliny i stosowanego podczas hodowli stężenia FeSO<sub>4</sub>, w porównaniu z roślinami niepotraktowanymi FeSO<sub>4</sub>, zaś związanemu w różnych formach przez rośliny żelazu towarzyszą substancje osłaniające komórki przed jego toksycznym działaniem, czyli naturalne przeciwutleniacze, w tym tokochromanole, karoten i witaminę C.

4. Kompozycja według zastrz. 3, **znamienna tym**, że otrzymywana jest ze skielkowanych nasion roślin strączkowych, krzyżowych lub ziarniaków zbóż, korzystnie z nasion roślin strączkowych, wzrastających w hodowlach hydroponicznych w warunkach stresu abiotycznego.

5. Kompozycja według zastrz. 3, **znamienna tym**, że stanowi uniwersalny dodatek do żywności specjalnego przeznaczenia lub nutraceutyk.

6. Zastosowanie kompozycji określonej zastrzeżeniami od 3 do 5 do wytwarzania preparatu do suplementowania diety człowieka w celu zapobiegania rozwojowi anemii wynikającej z niedoborów żelaza.

7. Zastosowanie według zastrz. 6, **znamienna tym**, że preparat stanowi uniwersalny dodatek do żywności specjalnego przeznaczenia i/lub nutraceutyk.

8. Zastosowanie według zastrz. 6 w żywności ekstrudowanej i innych produktach przetwórstwa zbóż, przemyśle koncentratów spożywczych, korzystnie do zup oraz sosów w proszku, mieszanek i koncentratów przypraw oraz w przemyśle owocowo-warzywnym, korzystnie do soków przecierowych.

Rysunki

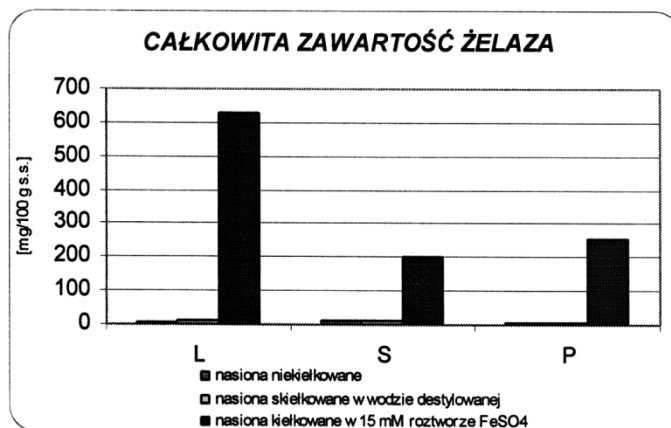


Fig. 1

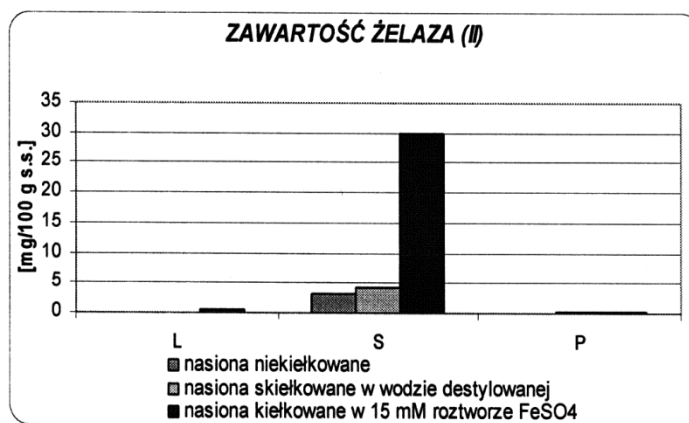


Fig. 2

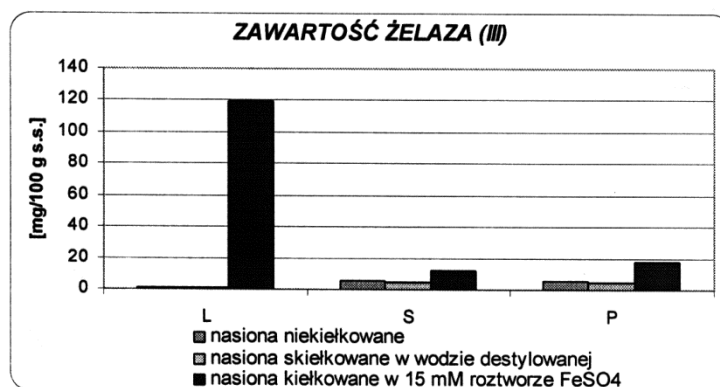


Fig. 3

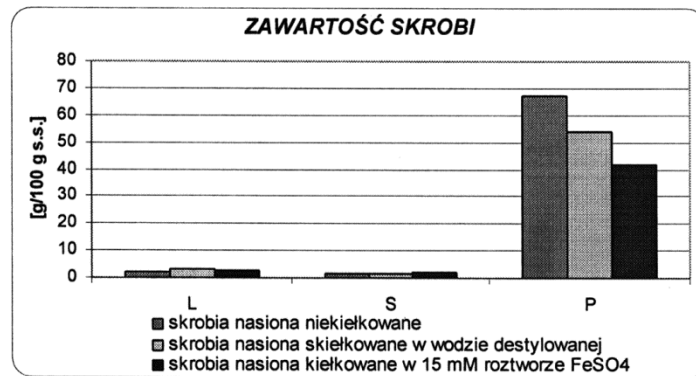


Fig. 4

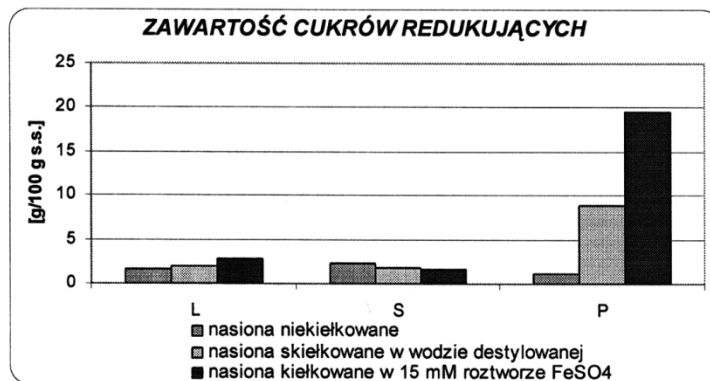


Fig. 5

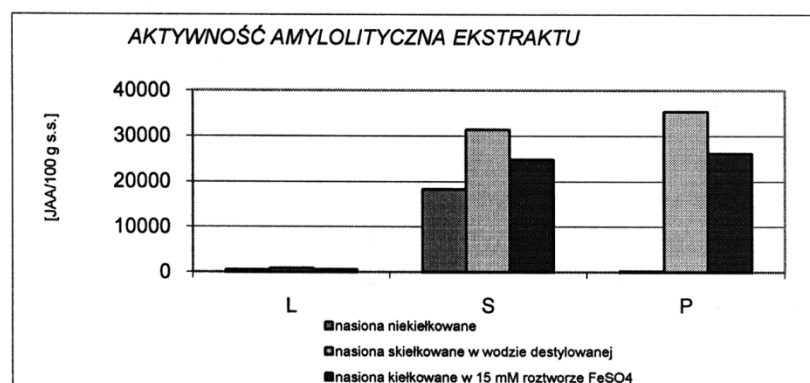


Fig.6

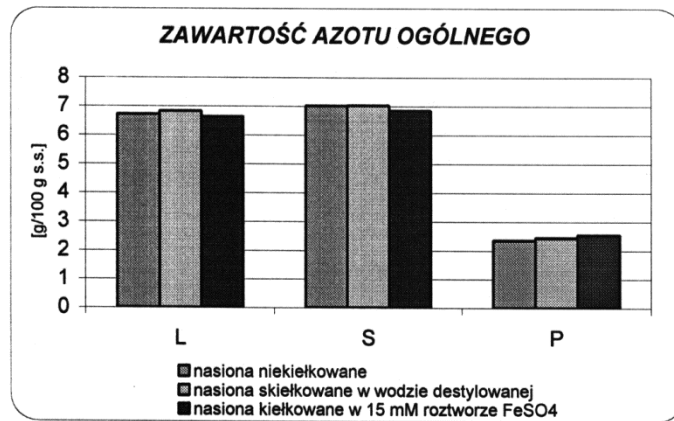


Fig. 7

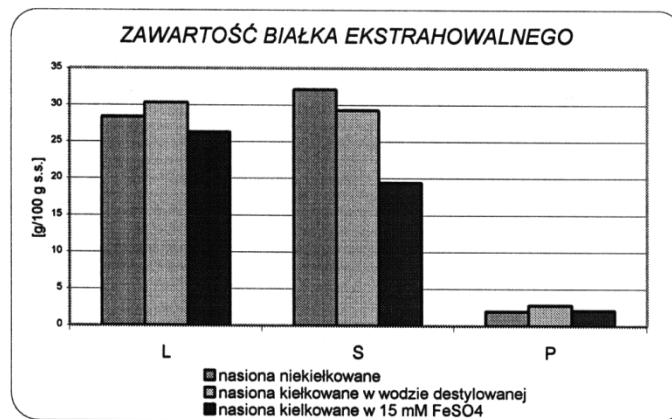
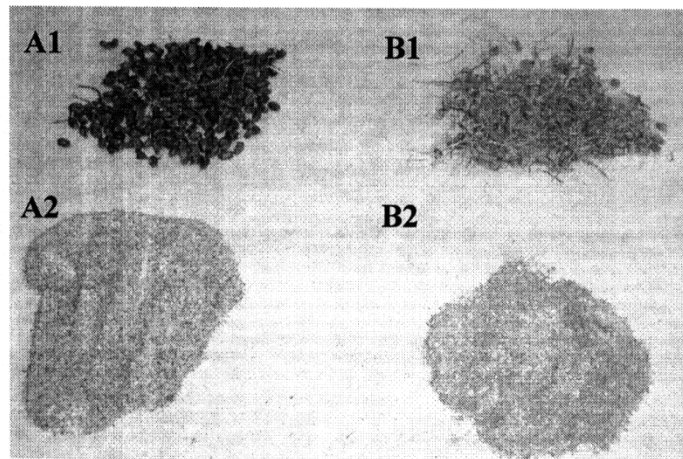


Fig. 8



**Fig. 9**