

## Sposób otrzymywania suchych ekstraktów triterpenów oraz błonnika i ich zastosowanie jako składników produktów żywnościowych

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania suchych ekstraktów triterpenów oraz błonnika, w szczególności ze skórek jabłek, i ich zastosowanie jako składników produktów żywnościowych, w szczególności mlecznych napojów fermentowanych i deserów owocowych na bazie przecieru jabłkowego, przeznaczonych dla diabetyków.

Triterpeny (kwas ursolowy, kwas oleanolowy i inne) występują powszechnie w tkankach wielu roślin, zarówno w formie wolnej, jak i związanej. Bogatym ich źródłem są owoce derenia jadalnego (*Cornus mas*) i świdośliwy (*Amelanchier alnifolia*). W znaczącej ilości występują one także w owocach jarzębiny (*Sorbus spp.*), aronii (*Aronia melanocarpa*) i rokitnika (*Hippophae rhamnoides*). Miąższ owoców głogu pierzastolistnego (*Crataegus pinnatifida*) może zawierać, w przeliczeniu na suchą masę, do 1,1 mg/g triterpenów, głównie kwasu ursolowego. W przypadku niektórych odmian jabłek zawartość triterpenów, głównie kwasu ursolowego, sięga 0,117 mg/g świeżego owocu. W odróżnieniu od cukrów prostych, które w owocach zlokalizowane są głównie w wakuolach komórek mezokarpu, triterpeny akumulowane są w głównie w egzokarpie (skórce), przy czym ich bezwzględna zawartość jest cechą odmianową. W skórce jabłek odmiany 'Piękna z Bokoop' zawartość kwasu ursolowego wynosi ok. 0,2%, a kwasu oleanowego 0,1%, podczas gdy u odmian takich jak 'Golden Delicious', 'Granny Smith' czy 'Jonagold' były one 10-krotnie wyższe. Kwas ursolowy może stanowić od 30 do 70% warstwy woskowej pokrywającej owoce. Naturalne triterpeny takie jak kwas ursolowy

i kwas oleanolowy oraz ich pochodne wywierają korzystny wpływ na pobieranie i metabolizm glukozy w komórkach zwierzęcych i łagodzą skutki insulinoodporności. W badaniach na zwierzętach wykazano, że mogą być one pomocne w terapii cukrzycy oraz patologicznej otyłości.

Znany jest z polskiego opisu patentowego nr 202948 sposób ciągłego uzyskiwania triterpenów z roślin i/lub części roślin, który obejmuje etapy: a) ciągłego doprowadzania części roślin i rozpuszczalnika, w którym rozpuszczalność triterpenów wynosi nie więcej niż 1 g/litr oraz wymywania części roślin rozpuszczalnikiem w przeciwnym kierunku w temperaturze 20°C do 70°C; b) ciągłego ekstrahowania triterpenów rozpuszczalnikiem w temperaturze od 50°C do 200°C i pod ciśnieniem 100 kPa do 30000 kPa w przeciwnym kierunku; c) ciągłego schładzania i odprężania roztworu zawierającego triterpeny, przez co triterpeny wykrystalizowują z rozpuszczalnika z etapu b); d) odsączenia triterpenów w temperaturze pokojowej; e) wymywania triterpenów rozpuszczalnikiem. Sposób charakteryzuje się tym, że triterpeny uzyskuje się z kory brzozy, korzystnie z białej części kory brzozy (z korka brzozy) o czystości przynajmniej 80%, korzystnie 85%, w szczególności 90%, a szczególnie korzystnie ponad 90%, przy czym główną część wyekstrahowanych triterpenów stanowi betulina, a zawartość betuliny wynosi przynajmniej 80%, korzystnie 85%, w szczególności 85%, a szczególnie korzystnie ponad 90%. Stosowanym rozpuszczalnikiem jest rozpuszczalnik wybrany z grupy zawierającej CO<sub>2</sub> w stanie nadkrytycznym, węglowodór o niskiej temperaturze wrzenia lub mieszanina, zawierająca węglowodory o niskiej temperaturze wrzenia, w szczególności n-pentan, n-heksan lub n-heptan, a poza tym w etapie a) uzyskiwania triterpenów jako rozpuszczalnik stosuje się rozpuszczalnik odpadowy z etapu drugiego, wymywanie w etapie a) uzyskiwania triterpenów prowadzi się pod ciśnieniem 100 kPa do 30000 kPa, korzystnie 1000 do 3500 kPa, szczególnie korzystnie 2500 kPa, ekstrakcję w etapie b) uzyskiwania triterpenów prowadzi się w temperaturze od 50 do 200°C, korzystnie w temperaturze od 140 do 160°C, bardziej korzystnie w temperaturze 150°C i pod ciśnieniem 1000 do 3500 kPa, korzystnie 2500 kPa, krystalizację w etapie c) uzyskiwania triterpenów prowadzi się jako proces mikrokrytalizacji z przeciętną wielkością cząstek < 40 µm, w szczególności od 2 do 32 µm.

Znany jest z polskiego opisu patentowego nr 141399 sposób wytwarzania kwasu oleanolowego i jego soli z nagietka lekarskiego, w którym rozdrobnione ziele nagietka z kwiatami lub bez poddaje się bezpośrednio ekstrakcji 50-80% wodnym roztworem alkoholu alifatycznego, zawierającego nie więcej niż 3 atomy węgla, wyciąg zagęszcza się, a następnie poddaje hydrolizie gorącym 5-20% wodnym roztworem kwasu mineralnego, uzyskany osad odsącza się, przemywa wodą i ekstrahuje wodnym roztworem alkaliów uzyskując nierozpuszczalną w tym roztworze frakcję stanowiącą sólżądanego kwasu, którą oczyszcza się przez krystalizację z metanolu lub etanolu i przeprowadza działaniem kwasu mineralnego lub organicznego w wolny kwas oleanolowy.

Znany jest z europejskiego opisu patentowego EP1732875 sposób wyodrębniania kwasu oleanolowego z korzeni Lantany pospolitej, w którym proces obejmuje następujące etapy: a) uzyskanie wysuszonego korzenia Lantany pospolitej; b) rozdrabnianie wysuszonego korzenia z etapu (a) w celu otrzymania proszku; c) odtłuszczenie proszku do trzech razy rozpuszczalnikiem organicznym przez 6-12 godzin w temperaturze 30-40° C; d) ekstrahowanie odtłuszczonego proszku z jednego rozpuszczalnika do trzech razy w temperaturze 30-40° C przez 6-12 godzin; e) usuwanie rozpuszczalnika w etapie (d) w celu uzyskania surowego ekstraktu; f) wytrącanie surowego ekstraktu w celu uzyskania osadu, po częściowej krystalizacji osadu z jednego rozpuszczalnika do uzyskania kwasu oleanolowego.

Przykłady realizacji sposobu według wynalazku przedstawiono poniżej.

Przykład I

Skórki owocowe pobrane z przemysłowej linii do obierania poddano sortowaniu i zamrożono w temperaturze -25°C do czasu dalszego przetwarzania. Przed przerobem skórki rozmrożono do osiągnięcia temperatury otoczenia. Rozmrożone skórki jabłkowe zmieszano z wodą o temperaturze 40°C w proporcji 1:3. Skórki ekstrahowano wodą poprzez ciągłe mieszanie, które odbywało się w temperaturze 40°C przez 20 minut. Następnie skórki wytłoczono na prasie hydraulicznej, a wyciąki po rozładowaniu prasy zebrano, rozłożono na sitach i wysuszono w suszarce owiewowej przez 6 godzin w temperaturze 70°C. Po zmieleniu próbek i separacji do partii o średnicy

ziaren poniżej 100  $\mu\text{m}$  dodano je do napoju jogurtowego w ilości 0,4% otrzymując napój jogurtowy o zawartości triterpenów 20 mg/250 g produktu.

#### Przykład II

Skórki owocowe pobrane z przemysłowej linii do obierania zamrożono w temperaturze  $-25^{\circ}\text{C}$  do czasu dalszego przetwarzania. Przed przerobem skórki rozmrożono do osiągnięcia temperatury otoczenia. Rozmrożone skórki jabłkowe zmieszano z wodą o temperaturze  $40^{\circ}\text{C}$  w proporcji 1:3. Skórki ekstrahowano wodą poprzez ciągłe mieszanie, które odbywało się w temperaturze  $40^{\circ}\text{C}$  przez 20 minut. Następnie skórki wytłoczono na prasie hydraulicznej, a wytloki oddzielono i zamrożono. Zamrożone wytloki suszono w suszarce przemysłowej typu „Leśniczanka” w temperaturze  $80^{\circ}\text{C}$  przez 12 godzin. Suche wytloki poddano rozdrabnianiu i separacji do partii o średnicy ziaren poniżej 200  $\mu\text{m}$ , po czym dodano do napoju jogurtowego w ilości 0,3% otrzymując napój jogurtowy o zawartości triterpenów 20 mg/250 g produktu i zawartości błonnika ogółem 1,2 g/250 g.

Zawartość triterpenów, cukrów i błonnika w napoju jogurtowym przedstawia poniższa tabela.

Badany parametr	Jednostka	Jogurt A (z błonikiem)	Jogurt B (naturalny)
Kwas oleanolowy	mg/250 g	3,0	0,0
Kwas ursolowy	mg/250 g	17,5	0,0
Rebaudiozyd A	mg/l	140	132
Stewiozyd	mg/l	72	82
Laktoza	g/100 g	3,63	3,62
Glukoza	g/100 g	0,10	0,10
Galaktoza	g/100 g	0,40	0,39
Fruktoza	g/100 g	0,19	0,14
Błonnik ogółem (TDF)	g/100 g	0,48	0,23
Błonnik rozpuszczalny (SDF)	g/100 g	0,28	0,16
Błonnik nierozpuszczany (SDF)	g/100 g	0,19	0,07

Sposób otrzymywania suchych ekstraktów triterpenów i błonnika według wynalazku charakteryzuje się tym, że wytloki z jabłek sortuje się i zamraża w temperaturze  $-25^{\circ}\text{C}$ , następnie rozmraża się do temperatury otoczenia i miesza z wodą o temperaturze  $40^{\circ}\text{C}$  w proporcji 1:3, po czym wymieszane z wodą wytloki poddaje się jednostopniowej ekstrakcji poprzez ciągłe mieszanie w temperaturze  $40^{\circ}\text{C}$  przez okres 20 min, następnie wytłacza się na prasie,

suszy w temperaturze 70-80°C przez okres 6-12 h, rozdrabnia i separuje do średnicy ziaren poniżej 200 µm. Wynalazek obejmuje także zastosowanie suchych ekstraktów triterpenów i błonnika uzyskanych z wyłoków z jabłek opisanym wyżej sposobem jako składników produktów żywnościowych, korzystnie napojów mlecznych fermentowanych w ilości 0,2-1,5% lub deserów owocowych w ilości 0,2-1,5%.

Zaletą sposobu według wynalazku jest możliwość otrzymywania suchych ekstraktów triterpenów i błonnika ze skórek jabłkowych. Po przetworzeniu jabłek z pozostałych odpadów odzyskuje się cenne odżywcze i prozdrowotne składniki: kwas oleanolowy i kwas ursolowy, błonnik spożywczy oraz glikozydy kwercetyny w jednej frakcji suchej. Zaletą sposobu jest też to, że preparat zostaje pozbawiony frakcji węglowodanowej składającej się z sacharozy, glukozy, fruktozy i sorbitolu, co stanowi o jego przydatności do zastosowania w produktach dla diabetyków, natomiast pozostaje zachowana frakcja triterpenów składająca się z kwasów oleanolowego i ursolowego, wykazujących działanie ograniczające ryzyko cukrzycy typu II. Ponadto w preparacie obecne są glikozydy kwercetyny, wykazujące cenne właściwości zdrowotne. Preparat po procesie technologicznym zawiera do 80% błonnika ogółem i do 35 mg sumy triterpenów na 1 g preparatu. Ponadto poziom składników jest stabilny podczas rocznego okresu przechowywania w temperaturze 20°C.

Zastosowanie naturalnych preparatów z owoców o wysokiej zawartości triterpenów w produktach spożywczych wspomagających profilaktykę cukrzycy jest szczególnie uzasadnione, gdyż wyniki badań dowodzą, iż korzyści zdrowotne spożycia owoców i warzyw związane są nie tylko z aktywnością poszczególnych związków o właściwościach prozdrowotnych, ale również z ich uzupełniającym i synergistycznym oddziaływaniem. Wykazano, że triterpeny wraz z innymi substancjami bioaktywnymi i błonnikiem mogą mieć znaczenie w zapobieganiu chorobom nowotworowym, m.in. jelita grubego. Stąd zastosowanie naturalnych ekstraktów z owoców może mieć przewagę w porównaniu do efektów spożycia wysoko oczyszczonych preparatów zawierających wyizolowane triterpeny. Zastosowanie ekstraktów triterpenów do wytwarzania fermentowanych napojów mlecznych o obniżonej zawartości cukrów prostych i laktozy pozwala na skojarzenie naturalnego produktu, o składzie korzystnym dla diabetyków, z preparatem o właściwościach

nutraceutyku. W badaniach klinicznych kwas korosolowy podawany doustnie w dawce 32 lub 48 mg/dobę przez 2 tygodnie obniżał stężenie glukozy na czczo u pacjentów chorych na cukrzycę typu II. Osoby te na 45 dni przed badaniem przestały brać doustne leki hipoglikemizujące i nie zmieniały diety. Spadek ten wynosił odpowiednio 20 i 30% w porównaniu do wartości przed próbą (baseline). W innym badaniu kwas korosolowy podany jednorazowo w dawce doustnej 10 mg obniżał poziom glukozy w teście obciążenia 75 g glukozy u zdrowych osób. Biorąc pod uwagę wyniki tych prób klinicznych należy przyjąć, że dawka triterpenów w postaci mieszaniny kwasów ursolowego, oleanowego i korolosowego w przeliczeniu na kwas korosolowy w jednej porcji jogurtu powinna wynosić 20 mg przy założeniu, że pacjent będzie zjadał 2 porcje dziennie. Jest to jednak tylko założenie robocze, zaś dawki triterpenoidów stosowane we właściwym badaniu klinicznym będą ustalone na podstawie wyników badań in vitro i na zwierzętach oraz na podstawie wyników pilotażowych prób klinicznych.

Pełnomocnik:

