

Sposób wytwarzania preparatu z wycieków z czarnuszki i preparat z czarnuszki

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania preparatu i preparat z wycieków z czarnuszki o dużej zawartości białka i błonnika oraz zwiększonej aktywności antyoksydacyjnej.

Aktualne trendy żywieniowe wskazują na duże zainteresowanie produktami spożywczymi lub dodatkami funkcjonalnymi o zwiększonej zawartości białka, błonnika a także równocześnie zwiększonej aktywności antyoksydacyjnej. Nasiona czarnuszki (*Nigella sativa* L.) przez wieki były uznawane i stosowane jako lekarstwo na wiele chorób w medycynie tradycyjnej (Khan et al. 2011; Mohtashami, 2019; Thippeswamy i Naidu, 2005). Nasiona czarnuszki a szczególnie olej z nich pozyskany zawiera wiele aktywnych składników, w tym tymochinon, tymohydrochinon, ditymochinon, tymol, karwakrol, N-tlenek nigelliminy, nigellicynę, nigellidynę i alfa-hederynę (Randhawa i in. 2011). Związki aktywne wykazują różne właściwości w tym szczególnie przeciwutleniające i przeciwnowotworowe (Mahmoud i Abdelrazek, 2019; Ramadan, 2007). Niewiele badań dotyczy właściwości i wykorzystania produktów ubocznych z czarnuszki w tym wycieków po wyciśnięciu oleju. Poprzednie badania wykazały, że mogą one mieć wykorzystanie jako dodatek do chleba pszennego (Osman i in. 2015; Debonne i in. 2018) albo do chleba bezglutenowego (Al-Subhi, 2014; Coşkun i in. 2020) czy skrobiowego (Różyło i in. 2021). Mikronizacja jest procesem od niedawna stosowanym w produkcji żywności i jest niewiele dostępnych badań w tym kierunku. Nieliczne, dostępne wyniki badań dowodzą, że można zastosować tę technikę do bardzo drobnego rozdrabniania otrąb ryżowych (Yin i in. 2022), otrąb pszennych (Lin i in. 2021), łuski i otrąb owsianych (Dziki i in. 2022), wycieków z winogron (Bender i in. 2020) czy liści i łodyg szpinaku (Różyło i in. 2022). Nikt nie zajmował się określeniem wpływu procesu mikronizacji połączonego z fermentacją wycieków z czarnuszki na właściwości produktu końcowego.

Jeśli chodzi o opracowania patentowe preparatów na bazie czarnuszki, w publikacji **WO2016178589A1** ujawniona została kompozycja roślinna o właściwościach przeciwzapalnych, przeciwalergicznymi, przeciwastmatycznymi i/lub przeciwbakteryjnymi, zawierająca kombinację ekstraktów wykazujących działanie synergistyczne, otrzymanych między innymi też z nasion czarnuszki (*Nigella sativa*). Z publikacji zgłoszenia patentowego **CN110917248A** znana jest metoda ekstrakcji i separacji substancji czynnej z oleju z nasion czarnuszki a z publikacji

patentu **US11007243B2** - wspomagana enzymatycznie ekstrakcja nadkrytyczna nasion czarnuszki siewnej. Nie są znane rozwiązania dotyczące preparatu z wycieków z czarnuszki. Odnosnie wycieków z innych surowców roślinnych dostępne jest zgłoszenie patentowe dotyczące sposobu otrzymywania kwasów organicznych z ekstraktu z wycieków jabłkowych (**P.437539**) lub sposób otrzymywania preparatu oligosacharydów prebiotycznych z wycieków jabłkowych na drodze hydrolizy kwasowej i enzymatycznej (**P.434965**). Sposób otrzymywania preparatu prebiotycznego z wycieków jabłkowych na drodze hydrolizy enzymatycznej został opatentowany też w innym opracowaniu (**PL.221737**). Z poprodukcyjnych wycieków z nasion wiesiołka dziwnego (*Oenothera paradoxa*) wytworzono polifenolowy ekstrakt wiesiołka (**P.435623**).

Celem wynalazku jest zaproponowanie sposobu wytwarzania pełnowartościowego preparatu z wycieków z czarnuszki, które to wycieki nadal stanowią źródło cennych składników odżywczych.

Istotą sposobu wytwarzania preparatu z wycieków z czarnuszki **jest to**, że stosuje się produkt uboczny z tłoczenia na zimno nasion czarnuszki w temperaturze nie przekraczającej 50°C. Produkt ten wstępnie rozdrabnia się, a następnie mikronizuje i przygotowuje się wodny roztwór z mikronizowanych wycieków, które poddaje się fermentacji z wykorzystaniem kultur starterowych zawierających bakterie kwasu mlekowego. Po fermentacji otrzymany roztwór poddaje się liofilizacji, a następnie liofilizat rozdrabnia się do uzyskania formy proszku.

Mikronizację prowadzi się przynajmniej przez 10 minut i do uzyskania 50% cząstek o wymiarach nie większych niż $d_{50} \leq 80,2 \mu\text{m}$ i 90% cząstek o wymiarach nie większych niż $d_{90} \leq 312,2 \mu\text{m}$.

Wodny roztwór do fermentacji przygotowuje się stosując proporcję wycieki : woda od 1:1 do 1:3, najkorzystniej stosując proporcję wycieki : woda 1:2.

Fermentację prowadzi się przez 1-3 dni, najkorzystniej przez 2 dni.

Kultury starterowe zawierające bakterie kwasu mlekowego obejmują szczepy bakterii *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*.

Liofilizację prowadzi się w temperaturze nie wyższej niż 40°C.

Istotą preparatu z wycieków z czarnuszki **jest to**, że otrzymany jest on sposobem określonym powyżej i zawiera związki fenolowe w ilości nie mniejszej niż 22.62mg GAE/ g s.m. przed trawieniem i 28.31mg GAE/ g s.m. po trawieniu.

Przedmiot wynalazku przedstawiono szczegółowo poniżej w przykładowym wykonaniu.

Po przeprowadzeniu wstępnych pomiarów wycioki czarnuszki mikronizowano za pomocą młyna kulowego w różnych warunkach i parametrach, w konsekwencji dobrano istotnie zróżnicowane próby, które były mikronizowane przez 10 i 20 minut z prędkością 600 obrotów/min. Próby kontrolne i próby mikronizowane fermentowano wykorzystując kulturę starterową bakterii Vege C LYO (GAP Food Additives, Łopuszna, Polska), składającą się ze szczepów bakterii *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*. Wszystkie sfermentowane próbki liofilizowano (ALPHA 1-4 30°C, 63 Pa) i po tym procesie próbki rozdrabniano na młynie nożowym do uzyskania postaci proszku. Badania wykazały, że fermentacja roztworu wodnego wycioków z czarnuszki może być prowadzona przez 1-3 dni, przy różnym rozcieńczeniu wycioków (1:1; 1:2; 1:3; wycioki: woda). Najlepsze rezultaty, uwzględniające kosztochłonność i czasochłonność uzyskano dla roztworu 1:2 i czasu fermentacji 2 dni. Próbkę kontrolną porównano z próbkami fermentowanymi oraz mikronizowanymi przez 10 minut (10MF) i 20 minut (20MF).

Analiza składu chemicznego surowca

Podczas realizacji badań wykonano ocenę składu chemicznego surowca wykorzystanego do badań tj. wycioków z czarnuszki metodą Kjeldahla (ISO 20483:2013), tłuszcz metodą Soxhleta (ISO: 659:2009), popiół metodą spoielania (ISO 2171:2007), wilgotność metodą suszenia (ISO 712:2009) oraz zawartości błonnika pokarmowego przy użyciu metody Asp et al. (1983) oraz kaloryczności próbki za pomocą współczynników Atwatera opisanych przez Costantini i in. (2014).

Przeprowadzono analizę wielkości cząstek powstałych proszków na analizatorze laserowym Mastersizer 3000 (Malvern Instruments Ltd., Wielka Brytania) z przystawką do suchej dyspersji (Aero S) przy użyciu wcześniej opisanej metodologii. Podczas pomiarów wyznaczono średnie wielkości cząstek w objętości D [4; 3] [μm] oraz średni rozmiar cząstek na powierzchni D [3; 2] [μm]. Wielkości cząstek określono również dla 10% (Dv10), 50% (Dv50) i 90% (Dv90) całkowitej objętości próbki.

Strukturę proszków na poziomie atomowym badano metodą dyfrakcji rentgenowskiej z użyciem dyfraktometru Emprean (PANalytical). W tym celu zmierzono profile dyfrakcyjne w geometrii z krokiem 0.01°. Dyfraktometr był wyposażony w lampę z anodą miedzianą działającą przy 40 kV i 30 mA. Do utworzenia wiązki padającej jak

również rozproszonej zostały użyte szczelina 1/4 stopnia, szczelina rozbieżna i szczeliny Söllera. Do wykrywania promieniowania zastosowano detektor proporcjonalny, a czas zliczania wynosił 5 s dla każdego punktu danych.

Surowiec do badań stanowiły wytloki z czarnuszki które charakteryzowały się wilgotnością 5,9 g/100 g, zawartością białka 29,9 g/100 g, zawartością tłuszczu 23,05 g/100 g oraz zawartością błonnika 32,06 g/100 g (tab. 1).

Tabela 1. Podstawowy skład chemiczny odpadów tłoczonych z czarnuszki

Parametr	Zawartość
Wilgotność (g/100g)	5,87±0,27
Białko (g/100g)	29,86±1,15
Tłuszcz (g/100g)	23,05±1,41
Popiół (g/100g)	5,25±0,31
Błonnik pokarmowy (g/100g)	32,06±1,13
Węglowodany przyswajalne (g/100g)	3,91
Wartość odżywcza (kcal/100g)	407

W tabeli 2 przedstawiono wyniki wielkości cząstek proszków z wytlóków przed i po mikronizacji oraz fermentacji. W porównaniu z próbką kontrolną po procesie mikronizacji i fermentacji zaobserwowano znaczne zmniejszenie wielkości cząstek. Już 10 minut mikronizacji spowodowało ponad 4-krotny spadek wielkości cząstek D_{v50} z 374,7 do 80,2 μm . Średnie wymiary cząstek na powierzchni $D [3;2]$ i objętości $D [4;3]$ zmniejszyły się ponad 3-krotnie, odpowiednio z 195,7 μm do 49,4 μm oraz z 446 do 142 μm . 20 minut mikronizacji nie spowodowało tak znaczących zmian D_{v50} obniżyło się do 60,8 μm , $D [3;2]$ obniżyło się do poziomu 37,2 μm , a $D [4;3]$ do 85,6 μm .

Tabela 4. Wyniki rozkładu wielkości cząstek

	D [3;2] (μm)	D [4;3] (μm)	d10 (μm)	d50 (μm)	D90 (μm)
KWC	195,7 ± 23,9a	446 ± 37,4a	83,8 ± 2,0a	374,7 ± 6,9a	808,7 ± 11,5a
10MFWC	49,4 ± 1,0b	142 ± 1,9b	20,4 ± 0,3b	80,2 ± 3,3b	312,2 ± 39,8b
20MFWC	37,2 ± 0,7c	85,6 ± 2,3c	16,5 ± 0,1c	60,8 ± 0,5c	160,1 ± 3,9c

KWC – próbka kontrolna wytlóków z czarnuszki, 10MFWC- preparat z fermentowanych wytlóków z czarnuszki mikronizowanych przez 10 minut, 20MFWC – preparat z fermentowanych wytlóków z czarnuszki mikronizowanych przez 20 minut * wartości a–c w tej samej kolumnie oznaczonej różnymi literami są istotnie ($\alpha = 0,05$) różne.

Dla wszystkich badanych próbek to jest wytlóków kontrolnych oraz preparatów uzyskanych po mikronizacji i fermentacji uzyskano obrazy struktury wewnętrznej jako

amorficzne, na co wskazuje główny szeroki pik obecny na profilu dyfrakcyjnym przy 2θ około 20° . Otrzymane wartości średniej odległości międzyatomowej nie wykazują tendencji do zmian, a różnica między otrzymanymi wartościami jest bardzo mała (maksymalna różnica wynosi 0,005 nm). Powyższe pozwala wnioskować, że procesy fermentacji i mikronizacji nie wpływają na wewnętrzną strukturę proszków otrzymanych z odpadów tłoczonych z czarnuszki.

Tabela 3. Pozycje głównego pików i odpowiadająca im średnia odległość międzyatomowa w proszkach z wycieków czarnuszki

	2θ (deg)	d-przestrzeń (nm)
KWC	$19,90^\circ$	0,446
10MFWC	$20,07^\circ$	0,442
20MFWC	$19,84^\circ$	0,447

KWC – próbka kontrolna wycieków z czarnuszki, 10MFWC- preparat z fermentowanych wycieków z czarnuszki mikronizowanych przez 10 minut, 20MFWC – preparat z fermentowanych wycieków z czarnuszki mikronizowanych przez 20 minut * wartości a–c w tej samej kolumnie oznaczonej różnymi literami są istotnie ($\alpha = 0,05$) różne.

Tabela 4. Parametry biochemiczne wycieków z czarnuszki oraz preparatów mikronizowanych i fermentowanych

Nazwa próbki	TPC [mg GAE/g s.m.]		ABTS [EC 50 mg/ml]		DPPH [EC 50 mg/ml]	
	Przed trawieniem	Po trawieniu	Przed trawieniem	Po trawieniu	Przed trawieniem	Po trawieniu
KWC	$11.53 \pm 0.17a$	$14.45 \pm 0.21a$	$1.18 \pm 0.01c$	$1.77 \pm 0.04c$	$2.89 \pm 0.14c$	$32.66 \pm 2.42c$
10MFWC	$28.36 \pm 2.49b$	$35.48 \pm 3.11c$	$0.92 \pm 0.03a$	$1.16 \pm 0.06a$	$1.79 \pm 0.03a$	$5.19 \pm 0.12b$
20MFWC	$22.62 \pm 2.51c$	$28.31 \pm 4.12b$	$1.10 \pm 0.04b$	$1.56 \pm 0.09b$	$1.83 \pm 0.01b$	$3.20 \pm 0.13a$

KWC – próbka kontrolna wycieków z czarnuszki, 10MFWC- preparat z fermentowanych wycieków z czarnuszki mikronizowanych przez 10 minut, 20MFWC – preparat z fermentowanych wycieków z czarnuszki mikronizowanych przez 20 minut * wartości a–c w tej samej kolumnie oznaczonej różnymi literami są istotnie ($\alpha = 0,05$) różne.

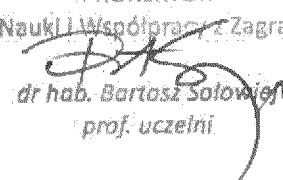
Przeprowadzone badania udowodniły, że jednoczesna mikronizacja i fermentacja wycieków wpłynęła pozytywnie na parametry biochemiczne próbki. Najlepsze wyniki uzyskano dla próbek mikronizowanych przez 10 minut i fermentowanych, dalszy proces mikronizacji nie dał już tak znaczącej poprawy parametrów biochemicznych. Całkowita zawartość związków fenolowych (TPC- Total phenolic content) w preparacie z wycieków z czarnuszki fermentowanym i mikronizowanym przez 10 minut była ponad 2,46 razy większa od próbki kontrolnej tj. samych wycieków z czarnuszki była równa 28,36 mg GAE/g s.m., po trawieniu próbki jeszcze większa i równała się 35,48 mg GAE/g s.m. (gdzie GAE jest ekwiwalentem kwasu galusowego). Aktywność przeciwrodnikowa


preparatu wyrażona wskaźnikiem EC₅₀ wobec ABTS przed trawieniem i po trawieniu była na korzystnie niskim poziomie równym 0,92 oraz 1,16 mg s.m./ml i znacznie niższym od próbki kontrolnej (1,18; 1,77). Aktywność przeciwrodnikowa preparatu wyrażona wskaźnikiem EC₅₀ wobec DPPH była również znacznie i istotnie korzystnie niższa przed trawieniem: 1,79 oraz po trawieniu: 5,19 mg s.m./ml od próbki kontrolnej, która charakteryzowała się bardzo dużą wartością po trawieniu aż 32,66 mg s.m./ml.

Spis literatury

1. Khan M. A., Chen H. C., Tania, M., Zhang, D. Z. Anticancer activities of *Nigella sativa* (Black Cumin). *African J. Tradit. Complement. Altern. Med.* 2011, 8(S), 226-232.
2. Mohtashami A. Effects of Bread with *Nigella Sativa* on Blood Glucose, Blood Pressure and Anthropometric Indices in Patients with Metabolic Syndrome. *Clin. Nutr. Res.* 2019, 8(2), 138-147.
3. Thippeswamy N. B., Naidu, K. A. Antioxidant potency of cumin varieties-cumin, black cumin and bitter cumin-on antioxidant systems. *Eur. Food Res. Technol.* 2005, 220, 472–476.
4. Randhawa M. A., Alghamdi M. S. Anticancer activity of *Nigella sativa* (Black Seed) - A review. *Am. J. Chinese Med.* 2011, 39(6), 1075-91.
5. Mahmoud Y. K., Abdelrazek H. M. A. Cancer: Thymoquinone antioxidant/pro-oxidant effect as potential anticancer remedy. *Biomed. Pharmac.* 2019, 115, 108783.
6. Ramadan M. F. Nutritional value, functional properties and nutraceutical applications of black cumin (*Nigella sativa* L.): An overview. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2007, 42(10), 1208-1218.
7. Osman, M. A. et al. Black cumin-fortified flat bread: Formulation, processing, and quality. *Qual. Assur. Saf. Crop. Foods*, 2015, 7(2), 233 - 238.
8. Debonne, E. et al. The influence of natural oils of blackcurrant, black cumin seed, thyme and wheat germ on dough and bread technological and microbiological quality. *LWT-Food Sci. Technol.* 2018, 93, 212–219.
9. Al-Subhi, F. M. M. Supplementation of pan bread with some cereals gluten free to decrease risk of celiac diseases. *Life Sci. J.* 2014, 11(2), 347-353.
10. Coşkun-Ö., Pehlivanoglu H., Gülseren, İ. Pilot scale assessment for seed protein enrichment of gluten-free breads at varying water content levels and after protein modification treatments. *J. Food Process. Preserv.* 2020, 44(7), e14512.
11. Yin, S., Liang, T., Jiao, S., & Jing, P. (2022). Improvement effects of micronization on morphology, functional and nutritional attributes of stabilized rice bran. *Food Research International*, 157. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111328>

12. Bender, A. B. B., Speroni, C. S., Moro, K. I. B., Morisso, F. D. P., dos Santos, D. R., da Silva, L. P., & Penna, N. G. (2020). Effects of micronization on dietary fiber composition, physicochemical properties, phenolic compounds, and antioxidant capacity of grape pomace and its dietary fiber concentrate. *LWT*, 117. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108652>
13. Lin, S., Jin, X., Gao, J., Qiu, Z., Ying, J., Wang, Y., ... Zhou, W. (2021). Impact of wheat bran micronization on dough properties and bread quality: Part I – Bran functionality and dough properties. *Food Chemistry*, 353. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129407>
14. Dziki, D., Gawlik-Dziki, U., Tarasiuk, W., & Różyło, R. (2022). Fiber Preparation from Micronized Oat By-Products: Antioxidant Properties and Interactions between Bioactive Compounds. *Molecules*, 27(9). <https://doi.org/10.3390/molecules27092621>
15. Różyło R, Piekut J, Dziki D, Smolewska M, Gawłowski S, Wójtowicz A, Gawlik-Dziki U. Effects of Wet and Dry Micronization on the GC-MS Identification of the Phenolic Compounds and Antioxidant Properties of Freeze-Dried Spinach Leaves and Stems. *Molecules*. 2022; 27(23):8174. <https://doi.org/10.3390/molecules27238174>

PROREKTOR
ds. Nauki i Współpracy z Zagranicą

dr hab. Bartosz Solowjow
prof. uczelni


mgr inż. Magdalena Tarala
RZECZNIK PATENTOWY
Nr 3268