

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **223494**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **398858**

(51) Int.Cl.
A61K 36/31 (2006.01)
A01N 65/34 (2009.01)

(22) Data zgłoszenia: **17.04.2012**

(54) **Sposób wydzielania substancji biobójczych, w szczególności glukozynolanów, izotiocyjanianów i indoli, z soku kapusty białej**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
28.10.2013 BUP 22/13

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
31.10.2016 WUP 10/16

(73) Uprawniony z patentu:

**INSTYTUT CHEMII PRZEMYSŁOWEJ
IM. PROF. IGNACEGO MOŚCICKIEGO,
Warszawa, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**IRENA GRZYWA-NIKSIŃSKA, Warszawa, PL
RYSZARD HEROPOLITAŃSKI, Warszawa, PL
MAŁGORZATA MACHAŁOWSKA,
Warszawa, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Królikowska

PL 223494 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wydzielania substancji biobójczych, w szczególności glukozynolanów, izotiocyjanianów i indoli, z soku kapusty białej, metodą selektywnej sorpcji i desorpcji.

W nowoczesnym rolnictwie, oprócz sztucznych i naturalnych nawozów, stosowane są również duże ilości środków ochrony roślin. Trudno jest w obecnej chwili wyobrazić sobie masową produkcję rolną bez używania środków niszczących wszelkiego rodzaju szkodniki, grzyby lub pleśnie. Spryskiwanie drzew i krzewów owocowych oraz nasion siewnych środkami ochrony roślin umożliwia uzyskiwanie dorodnych owoców i warzyw, odpornych na grzyby i inne szkodniki. Niestety są również ujemne skutki stosowania takich środków chemicznych – są one często silnie toksyczne dla ludzi i zwierząt, a ponadto przyczyniają się do zanieczyszczenia środowiska.

Istnieje niewielka produkcja owoców i warzyw z tzw. upraw ekologicznych, w której nie stosuje syntetycznych środków ochrony roślin oraz nawozów sztucznych. Jednak jest to produkcja mało licząca się w globalnej produkcji żywności.

Znane są związki występujące naturalnie w roślinach, działające podobnie jak syntetyczne środki ochrony roślin. Na przykład, niektórzy rolnicy w celu ochrony stosują wywary z pokrzywy do spryskiwania krzaków pomidorowych. Pozwala to na uzyskiwanie owoców dobrze wykształconych, bez pleśni i grzybów.

Stwierdzono, że w soku kapusty również występują substancje o właściwościach silnie grzybobójczych i bakteriobójczych, hamujące wzrost pasożytów. Stanowią je głównie glukozynolany, a szczególnie produkty ich rozpadu – izotiocyjaniany i indole. Substancje te występują w różnych gatunkach kapusty, w różnych ilościach. Generalnie są to niewielkie ilości, nie przekraczające kilkunastu do kilkudziesięciu promili. Niskie stężenie substancji czynnych w soku kapusty powoduje, że ich wydzielenie w postaci zatężonej lub suchej jest trudne i kosztowne. Natomiast stosowanie soku bezpośrednio wyciśniętego z kapusty daje niskie efekty.

Stwierdzono również, że kapusta posiada zdolność asymilowania z gleby metali, takich jak ołów, kadm, arsen, cynk, a to stymuluje produkcję glukozynolanów – prekursorów izotiocyjanianów i indoli. Obecnie nie są znane efektywne metody wydzielania substancji biobójczo aktywnych z soku kapusty. Zatężanie roztworu przez odparowanie jest bardzo kosztowne. Podobnie ekstrakcja rozpuszczalnikami nie dała zadowalających wyników.

Sposób według wynalazku eliminuje te trudności i pozwala na uzyskanie substancji biobójczo aktywnych z soku kapusty w sposób stosunkowo prosty technologicznie i ekonomiczny.

Nieoczekiwanie okazało się, że zastosowanie metody selektywnej sorpcji i desorpcji na sorbentach niejonowych pozwala na znacznie bardziej efektywne wydzielenie substancji biobójczych z soku kapusty, w porównaniu do znanych metod.

W wyniku przeprowadzonych wielu prób stwierdzono, że niektóre syntetyczne sorbenty niejonowe koncentrują na swojej powierzchni substancje aktywne biobójczo z soku kapusty, przy czym inne substancje organiczne sorbowane są tylko w minimalnych ilościach. Wykorzystywane jest tu zjawisko adsorpcji fizycznej, polegające na oddziaływaniu międzycząsteczkowym (siły van der Waalsa) w wyniku którego struktura cząsteczek zaadsorbowanych nie zmienia się, dzięki czemu nie tracą one swojej aktywności.

W sposobie według wynalazku stosuje się sok, który uzyskuje się dowolną metodą, z dowolnej odmiany kapusty białej. Przykładowo rozdrobnioną kapustę można przepuścić przez prasę, bądź, w małej skali, przez sokowirówkę.

Świeżo wyciśnięty sok z kapusty jest mętny, z dużą ilością zawiesin, które przed rozpoczęciem procesu sorpcji zaleca się usunąć w celu uniknięcia ewentualnego blokowania porów sorbentu przez drobne osady.

Sposób wydzielania substancji biobójczych, w szczególności glukozynolanów izotiocyjanianów i indoli, z soku kapusty białej, metodą selektywnej sorpcji i desorpcji, według wynalazku charakteryzuje się tym, że sok z kapusty, ewentualnie po uprzednim usunięciu z niego osadów, przepuszcza się przez złożę makroporowego syntetycznego sorbentu niejonowego o powierzchni niepolarniej lub średniopolarnej, a następnie desorbuje się substancje biobójcze przepuszczając przez złożę sorbentu niejonowego organiczny rozpuszczalnik silnie polarny o liczbie atomów węgla w cząsteczce od C₁ do C₃, korzystnie metanol, etanol lub aceton, po czym otrzymany eluat ewentualnie dodatkowo zatęży się znanymi metodami.

Korzystnie jako makroporowaty syntetyczny sorbent niejonowy o powierzchni niepolarniej lub średniopolarnej stosuje się sorbent typu Amberlite XAD-7 lub typu Amberlite XAD-16 o uziarnieniu 0,56–0,71 mm.

Sok z kapusty korzystnie jest przepuszczać przez kolumnę lub szeregowo połączone kolumny wypełnione sorbentem niejonowym, najkorzystniej przez dwie kolumny połączone szeregowo.

Według wynalazku sok z kapusty pozbawiony osadu korzystnie otrzymuje się po przepuszczeniu soku przez prasę filtracyjną i lub po zakwaszeniu go do pH poniżej 6, następnie oddzieleniu klarownego soku znanymi metodami.

Korzystnie sok z kapusty zakwasza się organicznym kwasem, najkorzystniej kwasem mlekowym, kwasem octowym lub kwasem cytrynowym.

Według wynalazku korzystnie jest przed procesem desorpcji złoże sorbentu niejonowego przemyć wodą.

Eluaty dodatkowo zatężeją się korzystnie przez odparowanie rozpuszczalnika organicznego, najkorzystniej pod zmniejszonym ciśnieniem, i ewentualnie dalej suszy się, najkorzystniej w suszarni rozpyłowej.

Przemywanie złoże sorbentu niejonowego wodą, przed procesem desorpcji, ma na celu odmycie ewentualnie pozostałego soku w przestrzeni międzyziarnowej sorbentu.

W sposobie według wynalazku uzyskuje się eluat stanowiący silnie zatężony roztwór substancji aktywnych, który można stosować bezpośrednio na rośliny jako preparat grzybobójczy i bakteriobójczy. Roztwór ten można dodatkowo zatężyć lub całkowicie wysuszyć, stosując znane metody, najkorzystniej suszenie rozpyłowe.

Uzyskane sposobem według wynalazku preparaty, w postaci suchej lub roztworów, mogą być stosowane na szeroką skalę jako środki ochrony roślin nieszkodliwe dla ludzi i zwierząt. Mogą one w przyszłości wyeliminować silnie szkodliwe pestycydy i inne stosowane obecnie preparaty syntetyczne. Wysoce prawdopodobne jest również zastosowanie ich w przyszłości jako naturalne antybiotyki.

Sposób wydzielania substancji biologicznie czynnych z soku kapusty według wynalazku zilustrowano w przykładach.

P r z y k ł a d 1.

Z surowej, poszatkowanej białej kapusty wyciśnięto sok na prasie, przeznaczonej do wyciskania soku z owoców, następnie poddano filtracji i wirowaniu. Sok zakwaszono 80%-owym kwasem mlekowym do pH 5,2. W niedługim czasie po zakwaszeniu zawiesina zaczęła opadać. Roztwór, po zakwaszeniu, poddano wirowaniu. Uzyskano ciecz całkowicie klarowną o pH 5,0 i o Transmitancji T 67,5 (barwa w procentach transmitancji, przy długości fali λ 600, oznaczana na spektrofotometrze). Zawartość suchej masy w cieczy wynosiła 6,73% wag., zaś popiołu 0,53% wag. Klarowną ciecz przepuszczono przez dwie szklane kolumny pracujące szeregowo, połączone węzami silikonowymi, wypełnione po 1000 cm³ sorbentu każda. Zastosowano kolumny o pojemności 1200 cm³ każda, zamknięte u dołu spiekami szklanym. Makroporowaty sorbent niejonowy średniopolarny stanowił produkt o nazwie handlowej Amberlite XAD-7HP, produkcji firmy Rohm and Haas o uziarnieniu 0,50–0,71 mm. Klarowną ciecz dozowano na górę pierwszej kolumny, przy pomocy dozującej pompy perystaltycznej, z prędkością 4 objętości cieczy na objętość sorbentu w jednej kolumnie, na godzinę (4 obj/obj/h). Ciecz wypływając dołem pierwszej kolumny przechodziła na górę drugiej kolumny. Przebieg procesu sorpcji kontrolowano badając wycieki z pierwszej i z drugiej kolumny na zawartość izotiocyjanianów. Przez układ kolumn przepuszczono 150 objętości cieczy, licząc na objętość sorbentu w kolumnie. Po przepuszczeniu tej ilości cieczy stwierdzono przebicie złoże sorbentu w kolumnie pierwszej, przez substancje czynne. Proces przepuszczania przez złoże sorbentu cieczy przerwano, kończąc tym pełen cykl sorpcji. W tym czasie wycieki z kolumny pracującej jako druga nie wykazywały obecności izotiocyjanianów. Oznacza to, że substancje aktywne znajdujące się w dozowanej cieczy zostały całkowicie zaadsorbowane na pierwszej kolumnie. Przed procesem desorpcji złoże sorbentu przemyto wodą, w celu odmycia soku znajdującego się pomiędzy ziarnami sorbentu w pierwszej kolumnie. W tym celu na kolumnę pierwszą dozowano wodę destylowaną z prędkością 2 obj/obj/h. Podczas przepuszczania wody ciecz przechodziła przez złoże obu kolumn. Wymywana w ten sposób z pierwszej kolumny ciecz, zawierająca substancje aktywne, przechodziła przez złoże drugiej kolumny, która substancje te adsorbowała. Przez kolumny przepuszczono 1 objętość wody, licząc na objętość sorbentu w kolumnie. Po przepuszczeniu wody – odmyciu soku, kolumnę pierwszą odłączono i poddano desorpcji.

Desorpcję substancji czynnych ze złoża sorbentu prowadzono w następujący sposób:

Wodę przemywającą złożę spuszczone do poziomu sorbentów, aby zmniejszyć rozcieńczenie dozowanego następnie eluentu, jako eluent stosowano alkohol metylowy. Alkohol metylowy dozowano od góry kolumny z prędkością 1,5–2 obj/obj/h, obserwując wyciek z kolumny. Po zadozowaniu 0,4 objętości metanolu, licząc na objętość sorbentu w kolumnie, zaobserwowano lekką zmianę barwy wycieku (zabarwienie lekko żółte) świadczącej o obecności w nim substancji czynnych, co zostało potwierdzone analizą na zawartość izotiocyjanianów. W tym momencie rozpoczęto odbieranie głównej frakcji eluatu. W miarę przepuszczania eluenta wyciek z kolumny stawał się coraz ciemniejszy, ostatecznie osiągnął barwę porównywalną z barwą mocnej kawy. Po przepuszczeniu 2 objętości metanolu, licząc na objętość sorbentu w kolumnie, wyciek z kolumny był zupełnie jasny. Przerwano dozowanie metanolu i proces uznano za zakończony. Uzyskano 2 objętości eluatu o pH 4,98 i o Transmitancji T 20 (przy długości fali λ 600, oznaczona na spektrofotometrze). Zawartość suchej masy w eluacie wynosiła 2,1% wag., w tym zawartość substancji biologicznie czynnych wynosiła 85% wag. Uzyskany eluat nie zawierał popiołu, co świadczy o tym, że całą suchą masę stanowiła substancja organiczna. Zawartość suchej masy oznaczono analitycznie, znaną metodą. Eluat zawierał 24% wag. wody. Zawarty w eluacie metanol odparowanie pod zmniejszonym ciśnieniem, i uzyskano ciecz o zawartości 9% wag. suchej masy. Po odebraniu całej ilości eluatu, prowadzono dalszą regenerację sorbentu. Z sorbentu całkowicie odmyto wodą użyty do desorpcji metanol. Pierwszą objętość wycieku skierowano do odzysku metanolu, następnie porcje skierowano do ścieków. Ogółem do odmycia metanolu użyto 2 objętości wody, licząc na objętość sorbentu w kolumnie. Po tej operacji stwierdzono całkowitą regenerację sorbentu – kolumnę można było użyć jako kolumnę drugą w następnym cyklu sorpcji. Natomiast kolumna pracująca do tej pory w szeregu kolumn jako druga zostaje użyta w następnym cyklu sorpcji jako kolumna pierwsza. W ten sposób prowadzona jest na przemian sorpcja i desorpcja.

Przykład 2.

Z surowej, poszatkowanej białej kapusty wyciśnięto sok na prasie, przeznaczonej do wyciskania soku z owoców, następnie poddano filtracji i wirowaniu. Sok zakwaszono 50%-owym kwasem mlekowym do pH 4,5. W niedługim czasie po zakwaszeniu zawiesina zaczęła opadać. Roztwór, po zakwaszeniu, poddano wirowaniu. Uzyskano ciecz całkowicie klarowną o pH 4,4 i o Transmitancji T 69 (barwa w procentach transmitancji, przy długości fali λ 600, oznaczona na spektrofotometrze). Zawartość suchej masy w cieczy wynosiła 6,9% wag., zaś popiołu 0,56% wag. Klarowną ciecz przepuszczono przez dwie szklane kolumny pracujące szeregowo, połączone węzami silikonowymi, wypełnione po 1000 cm³ sorbentu każda. Zastosowano kolumny o pojemności 1200 cm³ każda, zamknięte u dołu spiekami szklanym. Makroporowaty sorbent niejonowy niepolarny stanowił produkt o nazwie handlowej Amberlite XAD-16, produkcji firmy Rohm and Haas, o uziarnieniu 0,56–0,71 mm. Klarowną ciecz dozowano na górę pierwszej kolumny, przy pomocy dozującej pompy perystaltycznej z prędkością 2–3 objętości cieczy na objętość sorbentu w jednej kolumnie, na godzinę (2–3 obj/obj/h). Ciecz wypływając dołem pierwszej kolumny przechodziła na górę drugiej kolumny. Przebieg procesu sorpcji kontrolowano badając wycieki z pierwszej i z drugiej kolumny na zawartość izotiocyjanianów. Przez układ kolumn przepuszczono 180 objętości cieczy, licząc na objętość sorbentu w kolumnie. Po przepuszczeniu tej ilości cieczy stwierdzono przebicie złoża sorbentu w kolumnie pierwszej, przez substancje czynne. Proces przepuszczania przez złożę sorbentu cieczy przerwano, kończąc tym pełen cykl sorpcji. W tym czasie wycieki z kolumny pracującej jako druga nie wykazywały obecności izotiocyjanianów. Oznacza to, że substancje aktywne znajdujące się w dozowanej cieczy zostały całkowicie zaadsorbowane na pierwszej kolumnie. Przed procesem desorpcji złożę sorbentu przemyto wodą, w celu odmycia soku znajdującego się pomiędzy ziarnami sorbentu w pierwszej kolumnie. W tym celu na kolumnę pierwszą dozowano wodę destylowaną z prędkością 2 obj/obj/h. Podczas przepuszczania wody ciecz przechodziła przez złoża obu kolumn. Wymywana w ten sposób z pierwszej kolumny ciecz, zawierająca substancje aktywne, przechodziła przez złożę drugiej kolumny, która substancje te adsorbowała. Przez kolumny przepuszczono 1 objętość wody, licząc na objętość sorbentu w kolumnie. Po przepuszczeniu wody – odmyciu soku, kolumnę pierwszą odłączyło i poddano desorpcji.

Desorpcję substancji czynnych ze złoża sorbentu prowadzono w następujący sposób:

Wodę przemywającą złożę spuszczone do poziomu sorbentów, aby zmniejszyć rozcieńczenie dozowanego następnie eluentu. Jako eluent stosowano alkohol etylowy. Alkohol etylowy dozowano od góry kolumny z prędkością 1,5 obj/obj/h, obserwując wyciek z kolumny. Po wdozowaniu 0,5 objętości etanolu, licząc na objętość sorbentu w kolumnie, zaobserwowano lekką zmianę barwy wycieku (zabarwienie lekko żółte) świadczącej o obecności w nim substancji czynnych, co zostało potwierdzone

analizą na zawartość izotiocyjanianów. W tym momencie rozpoczęto odbieranie głównej frakcji eluatu. W miarę przepuszczania eluenta wyciek z kolumny stawał się coraz ciemniejszy, ostatecznie osiągnął barwę porównywalną z barwą mocnej herbaty. Po przepuszczeniu 2,5 objętości etanolu, licząc na objętość sorbentu w kolumnie, wyciek z kolumny był zupełnie jasny. Przerwano dozowanie etanolu i proces uznano za zakończony. Uzyskano 2,5 objętości eluatu o pH 4,65 i o Transmitancji T 45 (przy długości fali λ 600, oznaczona na spektrofotometrze). Zawartość suchej masy w eluacie wynosiła 1,85% wag., w tym zawartość substancji biologicznie czynnych wynosiła 82% wag. Uzyskany eluat nie zawierał popiołu, co świadczy o tym, że całą suchą masę stanowiła substancja organiczna. Zawartość suchej masy oznaczono analitycznie, znaną metodą, eluat zawierał 21% wag. wody. Zawarty w eluacie etanol odparowano, pod zmniejszonym ciśnieniem, i uzyskano ciecz o zawartości 8,5% wag. suchej masy. Po odebraniu całej ilości eluatu, prowadzono dalszą regenerację sorbentu. Z sorbentu całkowicie odmyto wodą użyty do desorpcji etanol. Pierwszą objętość wycieku skierowano do odzysku etanolu, następnie porcje skierowano do ścieków. Ogółem do odmycia etanolu użyto 2 objętości wody, licząc na objętość sorbentu w kolumnie. Po tej operacji stwierdzono całkowitą regenerację sorbentu – kolumnę można było użyć jako kolumnę drugą w następnym cyklu sorpcji. Natomiast kolumna pracująca do tej pory w szeregu kolumn jako druga zostaje użyta w następnym cyklu sorpcji jako kolumna pierwsza. W ten sposób prowadzona jest na przemian sorpcja i desorpcja.

Przykład 3.

Substancje biologicznie czynne z soku kapusty wydzielano identycznie jak przykład 1, z tą różnicą, że uzyskany eluat metanolowy, po wstępnym zateżeniu na wyparce obrotowej, pod zmniejszonym ciśnieniem, odparowywano całkowicie w suszarni rozpyłowej uzyskując suchy proszek o właściwościach grzybobójczych i bakterio-bójczych.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wydzielania substancji biobójczych, w szczególności glukozynolanów, izotiocyjanianów i indoli, z soku kapusty białej, metoda selektywnej sorpcji i desorpcji, **znamienny tym**, że sok z kapusty, ewentualnie po uprzednim usunięciu z niego osadów, przepuszcza się przez złożę makroporowatego syntetycznego sorbentu niejonowego o powierzchni niepolarniej lub średniopolarnej, a następnie desorbuje się substancje biobójcze przepuszczając przez złożę sorbentu niejonowego organiczny rozpuszczalnik silnie polarny o liczbie atomów węgla w cząsteczce od C₁ do C₃, korzystnie metanol, etanol, lub aceton, po czym otrzymany eluat ewentualnie dodatkowo zateża się znanymi metodami.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako makroporowaty syntetyczny sorbent niejonowy o powierzchni niepolarniej lub średniopolarnej stosuje się sorbent typu Amberlite XAD-7 lub typu Amberlite XAP-16.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że sok z kapusty przepuszcza się przez kolumnę lub szeregowo połączone kolumny wypełnione sorbentem niejonowym, najkorzystniej przez dwie kolumny połączone szeregowo.

4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że sok z kapusty pozbawiony osadu otrzymuje się po przepuszczeniu soku przez prasę filtracyjną i/lub po zakwaszeniu go do pH poniżej 6, następnie oddzieleniu klarownego soku znanymi metodami.

5. Sposób według zastrz. 4, **znamienny tym**, że sok z kapusty zakwasza się organicznym kwasem, najkorzystniej kwasem mlekowym, kwasem octowym lub kwasem cytrynowym.

6. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że przed procesem desorpcji złożę sorbentu niejonowego przemywa się wodą.

7. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że eluaty dodatkowo zateża się przez odparowanie rozpuszczalnika organicznego, najkorzystniej pod zmniejszonym ciśnieniem, i ewentualnie suszy się, najkorzystniej w suszarni rozpyłowej.

