

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu  
Wydział Chemii  
Katedra Chemii Fizycznej i Fizykochemii Polimerów

**Mariusz Banach**

**Praca doktorska**

**Wykorzystanie i optymalizacja zaawansowanych technik  
rozdzielczych do pozyskiwania i zateżnienia antocyjanów,  
jako składnika żywności funkcjonalnej**

Promotor pracy doktorskiej  
Prof. dr hab. Wojciech Kujawski

Opiekun pomocniczy  
Mgr Wojciech Cyplik

Toruń 2021

Pracę przyjmuję i akceptuję

.....  
*Data i podpis opiekuna pracy*

Potwierdzam złożenie  
pracy dyplomowej

.....  
*data i podpis pracownika dziekanatu*

Praca powstała w wyniku realizacji programu „Doktorat wdrożeniowy” w ramach zatrudnienia w firmie Greenvit sp. z o.o.

Badania współfinansowane ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Polska Wschodnia 2014-2020 Projekt pt.: „Dywersyfikacja działalności Greenvit Sp. z o.o. poprzez wdrożenie nowych standaryzowanych ekstraktów roślinnych produkowanych w oparciu o innowacyjne technologie” Nr projektu:  
POPW.01.03.01-20-0008/17

*Pragnę złożyć serdeczne podziękowania mojemu Promotorowi – Profesorowi dr. hab. Wojciechowi Kujawskiemu za pomoc naukową podczas prowadzenia prac badawczych i pisania niniejszej pracy.*

*Składam również podziękowania mojemu Opiekunowi Pomocniczemu – magistrowi Wojciechowi Cyplikowi za merytoryczne wsparcie i pomoc podczas realizacji badań.*

*Dziękuję Zarządowi firmy Greenvit za przyjazną atmosferę w pracy oraz umożliwienie rozpoczęcia studiów doktoranckich.*

*Dziękuję dr Aleksandrze Bojarczuk i dr Barbarze Khaidakov za pomoc naukową podczas pisania niniejszej pracy, cenne rady, wsparcie i motywację.*

## Spis treści

Wykaz skrótów stosowanych w pracy .....	7
I. WPROWADZENIE.....	9
II. CZĘŚĆ LITERATUROWA .....	11
1. Owoce jagodowe.....	11
1.1. Aronia czarnoowocowa .....	11
1.2. Bez czarny.....	13
1.3. Borówka czarna .....	15
2. Antocyjany.....	16
2.1. Struktura i właściwości chemiczne antocyjanów .....	16
2.2. Znaczenie antocyjanów w przyrodzie.....	19
2.3. Metody ekstrakcji antocyjanów .....	19
2.4. Metody analizy antocyjanów .....	20
3. Metody separacyjne .....	22
3.1. Chromatografia preparatywna i jej zastosowanie do separacji polifenoli .....	23
3.2. Ciśnieniowe procesy membranowe i ich zastosowanie w przemyśle spożywczym.....	24
3.2.1. Charakterystyka ciśnieniowych procesów membranowych .....	25
3.2.2. Najważniejsze parametry i pojęcia charakteryzujące techniki membranowe.....	28
3.2.3. Rodzaje membran stosowanych w procesach ciśnieniowych.....	29
4. Suszenie rozpyłowe ekstraktów roślinnych .....	32
5. CEL PRACY.....	34
III. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA.....	36
6. Materiały i metody.....	36
6.1. Surowce roślinne.....	36
6.2. Odczynniki i wzorce .....	36
6.3. Surowce chemiczne .....	36
6.4. Metody preparatywne .....	36

6.4.1. Ekstrakcja antocyjanów .....	36
6.4.2. Techniki membranowe .....	38
6.4.3. Chromatografia preparatywna .....	40
6.4.4. Suszenie rozpyłowe .....	42
6.5. Metody analityczne.....	42
6.5.1. Metody HPLC.....	42
6.5.2. Metody spektrofotometryczne .....	44
6.5.3 Oznaczenie suchej masy ekstraktów.....	46
6.6. Badania biologiczne.....	46
6.6.1. Właściwości przeciwzapalne ekstraktu z aronii <i>in vitro</i> .....	46
6.6.2. Test MTT .....	47
6.6.3. Warunki hodowli komórek do badania cytotoksyczności ekstraktów z owoców bzu czarnego .....	47
IV WYNIKI I DYSKUSJA.....	49
7.1. Ekstrakcja antocyjanów .....	49
7.1.1. Ekstrakcja antocyjanów z mrożonych wytlóków aronii czarnoowocowej.....	49
7.1.2. Ekstrakcja antocyjanów z mrożonych owoców aronii czarnoowocowej .....	56
7.1.3. Ekstrakcja antocyjanów z mrożonych owoców bzu czarnego.....	58
7.1.4. Ekstrakcja antocyjanów z suszonych wytlóków bzu czarnego .....	60
7.1.5. Ekstrakcja antocyjanów z mrożonych owoców borówki czarnej.....	62
7.2. Chromatografia preparatywna .....	63
7.2.1. Separacja antocyjanów z owoców aronii na żywicach adsorpcyjnych.....	63
7.2.2. Separacja antocyjanów z owoców bzu czarnego na żywicach adsorpcyjnych.....	64
7.2.3. Separacja antocyjanów z różnych owoców jagodowych na żywicy Sepabeads SP700 .	65
7.3. Separacja antocyjanów z wykorzystaniem technik membranowych.....	69
7.3.1. Mikrofiltracja.....	69
7.3.2. Ultrafiltracja.....	70

7.3.3. Nanofiltracja .....	77
7.4. Wyniki badań biologicznych ekstraktów .....	79
7.4.1. Badanie cytotoksyczności ekstraktu z aronii .....	79
7.4.2. Wpływ ekstraktu z aronii na czynnik martwicy nowotworów $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) i interleukinę $1\beta$ (IL- $1\beta$ ) w stymulowanych LPS komórkach RAW 264.7 .....	79
7.4.3. Wyniki badania wpływu ekstraktu z aronii na peroksydację lipidów metodą MDA .....	81
7.4.4. Wyniki badania cytotoksyczności ekstraktów z owoców bzu czarnego wobec różnych komórek nowotworowych .....	82
7.4.5. Wyniki badania cytotoksyczności ekstraktów z owoców bzu czarnego wobec zdrowych komórek krwi obwodowej (PBMC) .....	89
8. Wydajność prób produkcyjnych .....	92
9. Charakterystyka chemiczna i porównanie składu ekstraktów .....	94
9.1. Suchy ekstrakt z aronii .....	94
9.2. Suchy ekstrakt z owoców bzu czarnego .....	97
9.3. Suchy ekstrakt z borówki czarnej .....	99
10. Wdrożenie wyników badań w firmie Greenvit .....	101
10.1. Opis opracowanych metod produkcyjnych .....	101
10.2. Specyfikacje wdrożonych do produkcji ekstraktów .....	103
V. WNIOSKI .....	104
VI. SPIS TABEL I RYSUNKÓW .....	107
VII. BIBLIOGRAFIA .....	110
VIII STRESZCZENIE .....	131
IX ABSTRACT .....	134
X ZAŁĄCZNIKI .....	137
XI. DOROBEK NAUKOWY .....	147

## Wykaz skrótów stosowanych w pracy

BV (z ang. bead volume) – objętość żywicy

DVB (z ang. divinylbenzene) – diwinylobenzen

E/S – stosunek ekstrahenta do surowca

EDE (z ang. elderberry dry extract) – suchy ekstrakt z owoców bzu czarnego

HPLC (z ang. high performance liquid chromatography) – wysokosprawna chromatografia cieczowa

HILIC (z ang. hydrophilic interaction liquid chromatography) – chromatografia oddziaływań hydrofilowych

IL1- $\beta$  – interleukina 1 $\beta$

LC-MS (z ang. liquid chromatography-mass spectrometry) – chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas

LPS – lipopolisacharyd

MDA (z ang. malonyl dialdehyde) – dialdehyd malonowy

MF – mikrofiltracja

MTT - bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)- 2,5-difenylotetrazoliowy

MWCO (z ang. molecular weight cut-off) – graniczna masa cząsteczkowa

NF – nanofiltracja

PA - poliamid

PES – polieterosulfon

PUFA (z ang. polyunsaturated fatty acids) – wielonienasycone kwasy tłuszczowe

PVDF - poli(fluorek winylidenu)

RO (z ang. reverse osmosis) – odwrócona osmoza

RP-HPLC (z ang. reverse phase high performance liquid chromatography) – wysokosprawna chromatografia cieczowa w odwróconym układzie faz

SPE (z ang. Solid Phase Extraction) – ekstrakcja do fazy stałej

TFC (z ang. thin film composite) – cienki film kompozytowy

Tg (z ang. glass transition temperature) – temperatura zeszklenia

TNF- $\alpha$  (z ang. tumor necrosis factor ) – czynnik martwicy nowotworów  $\alpha$

UF- ultrafiltracja



## I. WPROWADZENIE

Prowadzone w ostatnich latach badania nad biologiczną funkcją wolnych rodników wykazują, że wolne rodniki reagują z lipidami, białkami, a także z DNA. Akumulacja produktów tych reakcji jest jedną z przyczyn rozwoju procesów degeneracyjnych, a następnie chorób cywilizacyjnych. Tym procesom można przeciwdziałać, dostarczając wraz z dietą odpowiednią ilość przeciwutleniaczy, które występują powszechnie w warzywach i owocach.

Ciemne owoce jagodowe takie jak aronia, bez czarny, czy borówka czarna są wyjątkowo bogate w przeciwutleniacze, przede wszystkim antocyjany. Surowce roślinne, w tym również owoce jagodowe, charakteryzują się jednak dużą zmiennością zawartości poszczególnych składników. Skład surowców roślinnych zależy od takich czynników jak odmiana, warunki uprawy oraz warunki klimatyczne. Ponadto, antocyjany są substancjami mało stabilnymi i ich zawartość zmienia się w trakcie przechowywania i obróbki. W czasie przetwarzania na soki i koncentraty owoce jagodowe poddaje się działaniu wysokiej temperatury w celu zagęszczenia i wyprodukowania koncentratu oraz ochrony przed rozwojem niepożądanych drobnoustrojów.

Powszechnie stosowanym sposobem konserwacji owoców jagodowych jest głębokie mrożenie. Jest to metoda umożliwiająca zachowanie właściwości odżywczych i prozdrowotnych, w tym zawartości antocyjanów na niezmiennym poziomie. Przechowywanie w stanie głębokiego zamrożenia wiąże się jednak ze znacznymi kosztami. Innym sposobem konserwacji owoców jagodowych jest suszenie. Wsuszone owoce nie wymagają kosztownego przechowywania w stanie głębokiego zamrożenia, ale z powodu obróbki termicznej obniża się zawartość antocyjanów. Kolejną metodą konserwacji owoców jagodowych jest liofilizacja, która nie wymaga obróbki termicznej ani przechowywania w stanie głębokiego zamrożenia, ale jest procesem energo- i czasochłonnym i z tego powodu drogim. Dodatkowo, zapewnienie jednorodności jakości owoców, np. stałej zawartości antocyjanów, w wielotonowych partiach owoców jest niezwykle trudne.

Nowatorską metodą przechowywania antocyjanów jest wytwarzanie ekstraktów suchych. Dzięki niskiej aktywności wody, takie ekstrakty są znacznie bardziej stabilne mikrobiologicznie i chemicznie a jednocześnie nie wymagają przechowywania w warunkach głębokiego zamrożenia. Mają również ściśle określoną standaryzację, gwarantującą minimalną określoną zawartość antocyjanów. Ekstrakty są też bardziej jednorodne, ponieważ wymieszanie partii ekstraktu, znacznie mniejszych od partii produkcyjnych surowców roślinnych jest już możliwe przy wykorzystaniu zwykłego mieszalnika. Wyprodukowanie ekstraktu o wysokiej

zawartości antocyjanów (powyżej 15%) nie jest jednak możliwe bez zastosowania metod separacyjnych.

Rozwiązania opracowane w ramach doktoratu wdrożeniowego obejmują wszystkie etapy produkcji ekstraktów takie jak ekstrakcja, separacja, zagęszczanie i suszenie. Wiele z tych rozwiązań zostało już wdrożonych w firmie Greenvit, która dzięki temu, wprowadziła do oferty standaryzowane na 25% antocyjanów ekstrakty z owoców bogatych w antocyjany. Surowcami zastosowanymi do produkcji ekstraktów były jedne z najbardziej popularnych owoców jagodowych, czyli aronia czarnoowocowa (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott), borówka czarna (*Vaccinium myrtillus* L.) oraz bez czarny. Ekstrakty, które są finalnymi produktami wprowadzonymi dzięki zastosowaniu niniejszych badań, mają zastosowanie przede wszystkim na rynku suplementów diety i naturalnych barwników spożywczych.

## II. CZĘŚĆ LITERATUROWA

### 1. Owoce jagodowe

#### 1.1. Aronia czarnoowocowa

##### Opis botaniczny i zawartość związków bioaktywnych

Aronia czarnoowocowa (*Aronia melanocarpa*) to krzew z rodziny różowatych pochodzący z Ameryki Północnej. W XIX wieku krzew został sprowadzony do Rosji, a w XX wieku uprawa aronii została rozpowszechniona w innych krajach Europy, gdzie wyhodowano liczne odmiany użytkowe. Roślina ta ma wysokość ok. 90-300 cm. Częścią użytkową są owoce, o średnicy około 6 mm, zebrane w baldachogrona zawierające po około 8-14 jagód. Liście o długości 3–7 cm są błyszczące i nieowłosione. Na terenie Polski (klimat umiarkowany, ciepły, przejściowy) biało-różowe kwiaty otwierają się w maju, a owoce zbierane są od połowy sierpnia do października. Roślina jest bardzo odporna na mrozy i nie wymaga używania środków ochrony roślin. Owoce można zbierać za pomocą kombajnu. Dzięki tym cechom uprawa aronii jest stosunkowo prosta i tania [1–3]. Owoce aronii, zależnie od warunków klimatycznych i odmiany zawierają około 15-30% suchej masy, w tym około 9,2-18,3% cukrów. Kwasowość ogólna wynosi 0,75-1,05 g kwasu cytrynowego $100\text{-g}^{-1}$  [1,4]. Owoce *A. melanocarpa* charakteryzują się wyższą niż większość innych owoców zawartością polifenoli, w szczególności antocyjanów. Dzięki wysokiej zawartości polifenoli jagody aronii charakteryzują się wysoką aktywnością przeciwutleniającą. Typowa zawartość antocyjanów w owocach aronii mieści się w przedziale 0,307% do 0,741% świeżej masy [2,5–7]. Jedynie Wu i współpracownicy oznaczyli znacznie wyższą zawartość antocyjanów, wynoszącą 1,48% [8]. Antocyjany aronii są glikozydami cyjanidyny: 3-O-galaktozyd, 3-O-arabinozyd, 3-O-glukozyd i 3-O-ksylozyd. Profil antocyjanów jest charakterystyczny dla *A. melanocarpa* i niezależnie od odmiany jest bardzo zbliżony. Najwięcej jest 3-galaktozydu cyjanidyny, który stanowi 60-65% antocyjanów aronii. 3-arabinozyd cyjanidyny stanowi około 25-30% antocyjanów owoców aronii. *A. melanocarpa* zawiera również niewielkie ilości 3-glukozydu i 3-ksylozydu cyjanidyny [2,5–7]. Dzięki zastosowaniu techniki LC-MS, w owocach aronii zidentyfikowano również śladowe ilości innych antocyjanów w ilości ok. 1,1% całkowitej ich zawartości [9].

Zawartość sumy związków fenolowych obecnych w jagodach aronii waha się w przedziale 0,85–3% świeżej masy [10,11]. Aronia charakteryzuje się wysoką zawartością tanin skondensowanych (proantocyjanidyn), którym zawdzięcza swój intensywnie cierpki smak. Są to oligomery i polimery zbudowane z jednostek flawan-3-oli, przede wszystkim epikatechiny.

Charakterystyczną cechą proantocyjanidyn aronii jest ich wysoki średni stopień polimeryzacji, wahający się, w przypadku aronii w przedziale 15,5–37,5 [8,12]. Wśród polifenoli aronii zidentyfikowano kwasy hydroksycynamonowe – chlorogenowy, neochlorogenowy oraz produkt ich degradacji – kwas kawowy. Jagody *A. melanocarpa* zawierają również flawonole – glikozydy kwercetyny i kwercetynę [13,14].

Owoce *A. melanocarpa* są również źródłem witamin C, B1, B2, B6, niacyny, kwasu pantotenowego i niektórych minerałów [15].

### **Prozdrowotne właściwości owoców aronii**

Właściwości kardioprotekcyjne, przeciwcukrzycowe, przeciwzapalne, immunomodulujące i przeciwnowotworowe owoców i ekstraktów z aronii są intensywnie badane [16–20]. Działanie kardioprotekcyjne i przeciwzapalne aronii analizowano w badaniach klinicznych pacjentów cierpiących na choroby układu krążenia [16]. W pracy Naruszewicza i współpracowników wykazano korzystny wpływ ekstraktu z aronii na układ sercowo-naczyniowy pacjentów po zawale mięśnia sercowego. Pacjentom z grupy badanej oprócz standardowego leczenia statynami podawano ekstrakt z owoców aronii. Badania te wykazały obniżenie poziomu markerów stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego u pacjentów przyjmujących ekstrakt z aronii w porównaniu z grupą placebo. Ekstrakt z aronii spowodował obniżenie poziomu 8-izoprostanu w surowicy, utlenionej lipoproteiny o niskiej gęstości (Ox-LDL), białka C-reaktywnego (hs-CRP) i białka chemotaktycznego monocytów (MCP-1) [21].

Wazoaktywne właściwości bogatych w antocyjany ekstraktów z owoców aronii wykazano w badaniach przeprowadzonych na wyizolowanych pierścieniach tętnic wieńcowych z nabłonkiem. Podanie ekstraktu z aronii spowodowało wazorelaksację zależną od dawki. Podobne działanie wykazywał w tych badaniach ekstrakt z owoców borówki czarnej. Co ciekawe, ekstrakt z owoców bzu czarnego nie wywołał takiego efektu [22]. Jednym z prawdopodobnych mechanizmów wazorelaksacji jest neutralizacja reaktywnych form tlenu (z *ang. reactive oxygen species* – ROS). ROS są wysoce reaktywne i mogą utleniać różne ważne biologicznie substancje, w szczególności lipidy takie jak wielonienasycone kwasy tłuszczowe (z *ang. polyunsaturated fatty acids* – PUFAs). To zjawisko nazywamy stresem oksydacyjnym [23]. Według Deneva i wsp. największe korzyści zdrowotne owoców aronii związane są z właściwościami antyoksydacyjnymi jej składników [24]. Potwierdzono korzystny wpływ ekstraktów z aronii na cukrzycę typu drugiego w badaniach na pacjentach, stwierdzając obniżenie poziomu cukru, cholesterolu, lipidów i glikowanej hemoglobiny u pacjentów [25].

## 1.2. Bez czarny

### Opis botaniczny i zawartość związków bioaktywnych

Bez czarny (*Sambucus nigra* L.) to gatunek dużego krzewu lub małego drzewa z rodziny piżmaczkowatych (*Adoxaceae*). Dawniej zaliczany był do rodziny bzuwaty i przewiertniowatych. Roślina ta występuje w większej części Europy, północnych częściach Afryki, w okolicach Kaukazu i północnej Turcji. Roślina ta, w wyniku aktywności ludzi trafiła do wschodnich Chin, Australii i Ameryki Północnej. Systematyka w obrębie rodzaju *Sambucus* nie została jednoznacznie ustalona i podział na gatunki i podgatunki budzi kontrowersje. Istnieje wiele odmian występujących naturalnie lub uprawianych, w tym także mieszańców. Z tego powodu klasyfikacja systematyczna rodzaju *Sambucus* jest trudna. *S. nigra* cechują duże, nieparzysto-pierzastozłożone liście. Roślina wytwarza baldachy z licznymi małymi białymi kwiatami pod koniec wiosny i wczesnym latem. Owocami są niebiesko-czarne jagody o średnicy do 6 mm dojrzewające pod koniec lata. Kwiaty i owoce są zbierane ze stanu naturalnego, a także uprawiane na plantacjach. Bez czarny jest również często uprawiany jako roślina ozdobna i użytkowa w przydomowych ogródkach [26–28]. Tradycyjnie używanymi częściami tej rośliny są owoce i kwiaty. Owoce bzu czarnego charakteryzują się wysoką zawartością antocyjanów. Zawartość antocyjanów jest zależna od odmiany, warunków klimatycznych oraz warunków uprawy i waha się w granicach od około 0,45 do nawet 1,4% świeżej masy. Profil antocyjanów czarnego bzu jest bardzo charakterystyczny. Większość to 3-O-sambubiozyd i 3-O-glukozyd cyjanidyny. W znacznie mniejszych ilościach występują cyjanidyno-3-O-sambubiozydo-5-O-glukozyd i cyjanidyno-3,5-di-O-glukozyd [8,28,29].

Zgodnie z Farmakopeą Amerykańską profil antocyjanów owoców europejskiego bzu czarnego jest ściśle określony. W analizie HPLC najwięcej powinno być 3-sambubiozydu a mniej 3-glukozydu cyjanidyny. Dwa kolejne antocyjany (cyjanidyno-3-O-sambubiozydo-5-O-glukozyd i cyjanidyno-3,5-di-O-glukozyd) występują w znacznie mniejszych ilościach. Mogą pojawić się piki od dodatkowych antocyjanów, ale żaden z nich nie jest większy niż pik cyjanidyno-3,5-di-O-glukozydu [30]. Zidentyfikowano jednak odmiany *S. nigra*, w których profilu antocyjanowym najwięcej jest 3-O-glukozydu cyjanidyny [28]. Jagody *S. nigra* są również źródłem flawonoli w postaci kwercetyny, 3-rutynozydu kwercetyny (rutyny) i 3-glukozydu kwercetyny w ilości 51,94-73,43 mg 100 g<sup>-1</sup> [28]. W owocach bzu oznaczono niewielkie ilości innych licznych flawonoidów oraz kwasy fenolowe – chlorogenowy i neochlorogenowy [31]. Bez czarny zawiera także substancje trujące – glikozydy cyjanogenne,

głównie sambunigrinę i prunazybę. Substancje te występują głównie w liściach, ogonkach liściowych i niedojrzałych owocach. W trakcie dojrzewania owoców zawartość tych substancji znacząco spada i z tego powodu należy używać wyłącznie w pełni dojrzałych jagód bzu. Korzystny wpływ wywiera w tym przypadku obróbka termiczna powodująca hydrolizę niestabilnych glikozydów cyjanogennych [32,33].

Popularność przetworów z bzu czarnego bardzo wzrosła od 2020 roku z powodu pandemii COVID-19. Konsumenci wykazują większe zainteresowanie składnikami ziołowymi o działaniu immunomodulującym i przeciwwirusowym. Dostawy niektórych produktów z czarnego bzu były opóźnione z powodu ograniczenia produkcji w Chinach i Indiach. Z tego powodu ekstrakty z owoców bzu i gotowe suplementy diety były często niskiej jakości lub zafałszowane. Charakterystyczny profil polifenoli, głównie antocyjanów owoców bzu czarnego umożliwia identyfikację zafałszowanych jagód bzu czarnego lub przetworów z tych owoców [34].

### **Prozdrowotne właściwości owoców bzu czarnego**

Czarny bez jest tradycyjnie stosowany w leczeniu przeziębień i grypy. Przeciwgrypowe właściwości ekstraktów z owoców bzu czarnego potwierdzono także w badaniach *in vitro* i *in vivo*. Pacjenci otrzymujący ekstrakt z jagód *S. nigra* chorowali krócej i odczuwali słabsze objawy grypy [35,36]. W badaniach *in vitro* wykazano, że mechanizm działania soku z owoców bzu czarnego polegał na bezpośrednim blokowaniu hemaglutyniny wirusa, która jest białkiem odpowiedzialnym za adhezję wirusa do infekowanej komórki. W podobny sposób działał czysty 3-glukozyd cyjanidyny – jeden z głównych antocyjanów owoców bzu czarnego. Dodatkowo, bez czarny działa również pośrednio, modulując uwalnianie cytokin, takich jak IL-6, IL-8 i TNF [37]. W 2021 roku wykazano hamowanie, w warunkach *in vitro*, wiązania domeny wiążącej receptor białka S1 wirusa SARS-CoV2 powodującego chorobę COVID-19 z rekombinowanym ludzkim enzymem konwertującym angiotensynę 2 (ACE2), która jest receptorem wirusa. Co ciekawe, silniej działał ekstrakt z owoców bzu czarnego zbieranych ze stanu naturalnego niż ekstrakt ze znanej i powszechnie uprawianej odmiany Haschberg [38].

Owoce bzu czarnego wykazują nie tylko działanie przeciwwirusowe. Wyniki badań wskazują na korzystny wpływ składników owoców bzu czarnego na układ krwionośny – ciśnienie krwi, zmniejszenie stresu oksydacyjnego oraz redukcję poziomu kwasu moczowego. W badaniach *in vitro* wykazano, że antocyjany ekstraktu z jagód bzu czarnego są wchłaniane przez komórki endotelium i chronią te komórki przed substancjami wywołującymi stres

oksydacyjny [39]. Składniki owoców *Sambucus nigra* mogą także wspomagać leczenie cukrzycy. Stwierdzono, że w warunkach *in vitro* ekstrakt z czarnego bzu oraz oczyszczone antocyjany stymulują wychwyt glukozy i kwasów tłuszczowych w komórkach mięśni szkieletowych, co jest hamowane w cukrzycy typu 2 [40]. Badane jest również przeciwnowotworowe działanie owoców bzu czarnego [13–16].

### 1.3. Borówka czarna

#### Opis botaniczny i zawartość związków bioaktywnych

Borówka czarna (*Vaccinium myrtillus* L.) jest gatunkiem krzewinki z rodziny wrzosowatych (*Ericaceae*). Roślina ta występuje powszechnie na terenach o klimacie umiarkowanym i arktycznym w Europie, Azji i Ameryce Północnej. W Polsce jest gatunkiem bardzo pospolitym. Rośnie w borach sosnowych, niektórych lasach liściastych, np. dąbrowach, buczynach, a także w nielicznych zbiorowiskach nieleśnych, np. na wrzosowiskach. Roślina rozrasta się dzięki kłączom tworząc rozległe łany. Części użytkowe *V. myrtillus* to owoce i liście pozyskiwane ze stanu naturalnego lub półupraw. Próby uprawy tego gatunku kończyły się niepowodzeniem. *V. myrtillus* w klimacie umiarkowanym ciepłym kwitnie pod koniec kwietnia i w maju, a owoce dojrzewają przez 40-60 dni od zapylenia [41–43].

Owoce borówki czarnej zawierają 15 antocyjanów zbudowanych z pięciu aglikonów (antocyjanidyn – delfinidyny, cyjanidyny, petunidyny, peonidyny i malwidyny) i cukrów (galaktozy, glukozy lub arabinozy). Z powodu wysokiej ceny owoców i przetworów z owoców borówki czarnej istnieje wysokie ryzyko ich fałszowania. Unikalny profil piętnastu antocyjanów ułatwia weryfikację autentyczności przetworów z owoców *V. myrtillus*, takich jak dzemy, soki lub ekstrakty [44,45].

Zgodnie z pracą przeglądową Pires i wsp. [45] w owocach borówki czarnej zidentyfikowano liczne flawan-3-ole i flawonole w zmiennych ilościach, ale we wszystkich zacytowanych publikacjach występowała jedynie katechina. Zidentyfikowano również kwercerynę i glikozydy kwercetyny, a także kamferol i jego glikozydy [45–47]. W jagodach oznaczono również kwasy fenolowe, w tym najwięcej kwasu trans-5-O-kawoilochinowego [45].

## **Prozdrowotne właściwości owoców borówki czarnej**

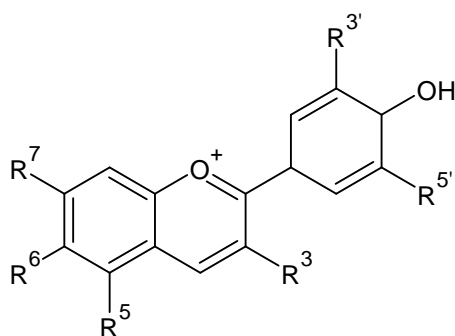
Czarne jagody, podobnie jak inne owoce o wysokiej zawartości antocyjanów, mają działanie przeciwutleniające. Antyoksydacyjne działanie tych owoców wykazano zarówno w badaniach *in vitro* jak i *in vivo* [48–50]. W badaniach *in vitro* wykazano, że ekstrakt z jagód borówki czarnej chroni komórki przed stresem oksydacyjnym wywołanym przez wodoronadtlenek tert-butylu, alkohol allilowy, a także promieniowaniem ultrafioletowym [49,51]. Wykazano również, że liofilizowany sok z borówki czarnej, liofilizowany sok z żurawiny, a także czysta cyjanidyna zmniejszyły produkcję reaktywnych form tlenu i peroksydację lipidów poprzez zwiększenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej w warunkach *in vitro* [50]. W badaniach *in vivo* stwierdzono poprawę tolerancji wysiłku w porównaniu z grupą placebo u pacjentów po zawale mięśnia sercowego, którzy oprócz terapii statynami zażywali dodatkowo liofilizowane owoce jagody czarnej. Stwierdzono również obniżenie utlenionego LDL. Co ciekawe, nie stwierdzono statystycznie istotnej zmiany aktywności przeciwutleniającej osocza [52]. Jagody borówki czarnej są tradycyjnie stosowane w suplementacji diety mającej na celu poprawę jakości widzenia. W badaniach naukowych potwierdzono korzystny wpływ owoców borówki czarnej i ekstraktów z tego owoców na narząd wzroku. Wykazano złagodzenie objawów suchego oka, jak również korzystny wpływ na naczynia krwionośne oka, korzystne działanie na jakość widzenia, czy spowolnienie rozwoju wysokiej krótkowzroczności [53–56].

## **2. Antocyjany**

### **2.1. Struktura i właściwości chemiczne antocyjanów**

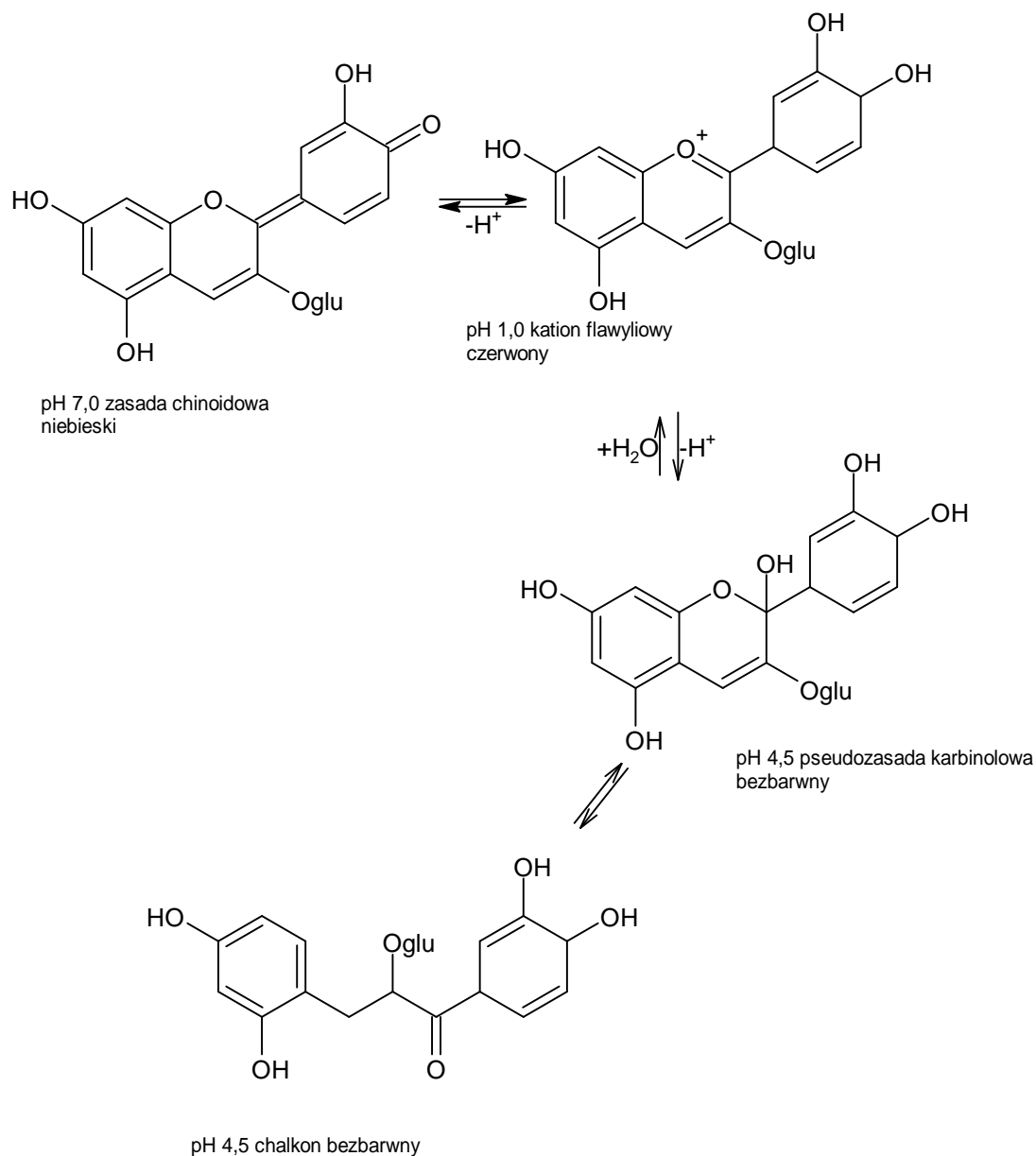
Antocyjany są naturalnymi barwnikami nadającymi czerwony, niebieski lub fioletowy kolor licznym owocom, warzywom i kwiatom. Ogólny wzór antocyjanów przedstawiono na Rysunku 1. Są to glikozydy barwnych antocyjanidyn, które są jedną z grup flawonoidów. Znanych jest kilkaset antocyjanów, różniących się rodzajem antocyjanidyny, rodzajem i liczbą reszt cukrowych oraz miejscem ich przyłączenia. Antocyjanidyny zbudowane są ze szkieletu kationu flawyliowego (2-fenylobenzopiryliowego) hydroksylowanego w różnych pozycjach (atomy węgla C3, C5, C6, C7 i C3', C4', C5' – Rysunek 1). W pozycjach 3 i/lub 5 przyłączone są wiązaniem O-glikozydowym reszty różnych cukrów [57,58]. Grupy hydroksylowe cukrów mogą być acylowane kwasami fenolowymi, np. kwasem synapinowym lub ferulowym [59].





Rysunek 1. Struktura antocyjanów. R<sup>3</sup>-R<sup>7</sup>: reszta cukru, -OH, -H lub -OCH<sub>3</sub>.

Antocyjany charakteryzują się różną barwą i widmem w spektroskopii UV-VIS, zależnie od pH środowiska. Zmiany widma są spowodowane przez różne stany jonizacji i przegrupowania elektronowe w cząsteczkach, zależne od stężenia protonów w środowisku. Strukturę antocyjanów zależnie od pH roztworu pokazano na Rysunku 2. W pH kwaśnym (<3) dominuje forma kationu flawyliowego. Forma ta jest najbardziej stabilna. Wraz ze wzrostem pH zawartość formy kationowej spada i równocześnie wzrasta ilość bezbarwnej pseudozasady karbinolowej wskutek nukleofilowego ataku cząsteczki wody. Antocyjany mogą ulegać kopigmentacji czyli zmiany. Przyczyną kopigmentacji są niekwalencyjne oddziaływania (w szczególności  $\pi$ - $\pi$  i oddziaływania hydrofobowe) cząsteczek antocyjanów, z innymi antocyjanami, lub bezbarwnymi substancjami takimi jak inne polifenole (np. flawonoidy, kwasy fenolowe, taniny) czy kwasy organiczne. Widocznym na zewnątrz przejawem kopigmentacji jest zwiększenie intensywności absorpcji oraz przesunięcie maksimum absorpcji w widmie UV-Vis [60].



Rysunek 2. Zależność struktury antocyjanów od pH na przykładzie 3-O-glukozydu cyjanidyny.

W roztworze o odczynie lekko kwaśnym i obojętnym (pH 5-8) wzrasta zawartość formy chinoidalnej o niebieskiej/fioletowej barwie [61]. Zmiany zabarwienia zależnie od pH środowiska wykorzystano w metodzie oznaczania antocyjanów z zastosowaniem spektroskopii UV-Vis [62]. Zależność struktury antocyjanów w zależności od pH mają wpływ na ich stabilność. Ma to duże znaczenie dla zastosowania tych substancji jako barwników spożywczych oraz podczas optymalizacji metod ekstrakcji i separacji. Najbardziej stabilną formą jest kation flawyliowy, w związku z czym antocyjany mają najwyższą stabilność w

pH $\leq$ 2,0. W wyższym pH spada zawartość kationu flawyliowego i substancje te będą ulegać coraz szybszej degradacji [61].

## **2.2. Znaczenie antocyjanów w przyrodzie**

Antocyjany w formie kationu flawyliowego o czerwonej barwie absorbują szkodliwe promieniowanie w zakresie ultrafioletu (ok. 280 nm.) oraz nieabsorbowane przez chlorofile światło zielone (ok. 500 nm.). Przypuszcza się, że dzięki tym właściwościom mogą pełnić funkcję fotoprotekcyjną. Pełnienie tej funkcji wymaga wydajnej absorpcji promieniowania i szybkiego powrotu do stanu podstawowego z rozproszeniem energii w formie ciepła. Przypuszczenie to zostało potwierdzone w doświadczeniach przeprowadzonych na dwóch odmianach begonii [63]. Liście jednej odmiany były zielone a drugiej czerwone dzięki zawartości antocyjanów. Odmiana o liściach czerwonych charakteryzowała się znacząco wyższą wydajnością fotoukładu 2 fotosyntezy w czasie i bezpośrednio po poddaniu roślin nadmiernemu naświetleniu [63,64]. W badaniach Zheng i wsp. [65] wykazano, że enzym – syntaza antocyjanowa, ulega u rzodkiewnika pospolitego bardziej wydajnej ekspresji pod wpływem nadmiernego naświetlania, co dodatkowo potwierdza funkcję ochronną antocyjanów [65]. Młode liście często są czerwone, co może być przyczyną tego, że czerwone liście są rzadziej atakowane przez roślinożerne owady. Z kolei antocyjany nadające kolor kwiatom są atraktantami dla owadów zapylających te kwiaty [66].

## **2.3. Metody ekstrakcji antocyjanów**

Ekstrakcja ze źródeł naturalnych jest główną metodą pozyskiwania antocyjanów. Ze względu na największą stabilność i rozpuszczalność antocyjanów w środowisku o odczynie kwaśnym, do ekstrakcji używa się rozpuszczalników zakwaszonych kwasami organicznymi lub mineralnymi. Z uwagi na polarność antocyjanów, do ich ekstrakcji stosowane są rozpuszczalniki polarne takie jak: woda, etanol, metanol, aceton i ich mieszaniny. Do przemysłowej ekstrakcji antocyjanów preferuje się stosowanie wody, etanolu lub ich mieszanin zakwaszonych kwasami dopuszczonymi do stosowania w przemyśle spożywczym [67–69]. Wysoką wydajność ekstrakcji antocyjanów osiągnąć można również używając wodnych roztworów siarczanów (IV) lub dwutlenku siarki. Siarczany (IV) zapobiegają utlenianiu antocyjanów oraz rozwojowi drobnoustrojów [70,71]. Mimo że siarczyny są powszechnie stosowane w przemyśle spożywczym jako konserwanty i przeciwutleniacze, to nawet niewielkie ilości powodują alergie [72] i z tego powodu należy ich zawartość deklarować na etykiecie, co może być niekorzystnie odbierane przez klientów.

Kolejnym, oprócz rodzaju ekstrahenta, czynnikiem mającym wpływ na wydajność ekstrakcji są temperatura i czas ekstrakcji. Wyższa temperatura zwiększa wydajność ekstrakcji dzięki przyspieszeniu dyfuzji i konwekcji. Z drugiej strony, zastosowanie zbyt wysokiej temperatury przyspiesza utlenianie antocyjanów oraz innych polifenoli i tym samym zmniejsza odzysk tych substancji w procesie ekstrakcji [73,74].

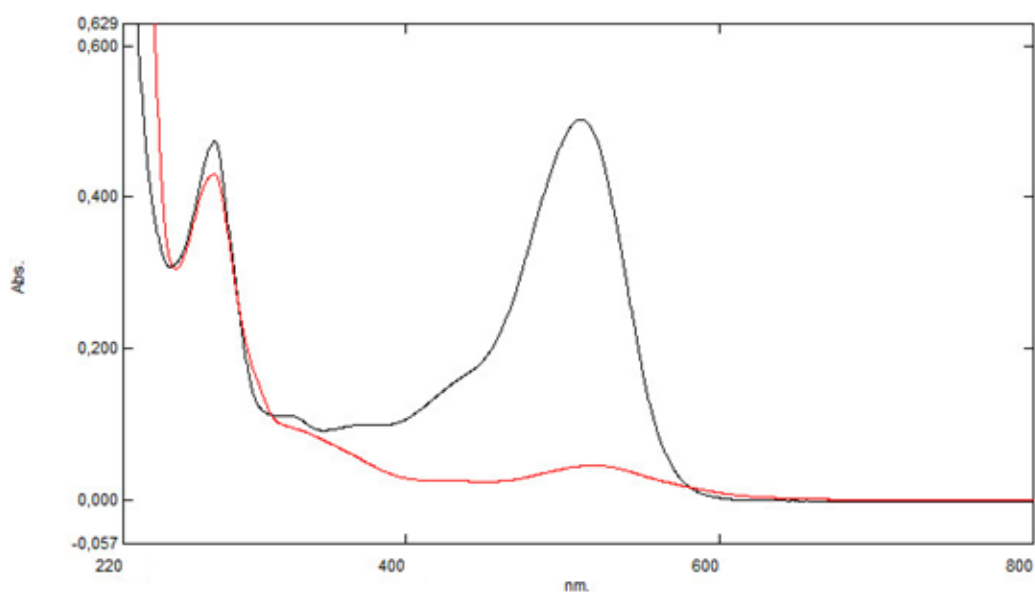
Na wydajność ekstrakcji ma również wpływ stosunek ekstrahenta do surowca. Zbyt niska wartość tego parametru obniża wydajność ekstrakcji. Natomiast zbyt wysoki stosunek ekstrahenta do surowca podwyższa koszt ekstrakcji, z powodu energochłonności etapu odparowania rozpuszczalnika. Obniżają się też możliwości przerobowe linii produkcyjnej [75,76].

Wydajność ekstrakcji substancji z materiału roślinnego można poprawić za pomocą dodatku enzymów hydrolizujących polisacharydy ścian komórkowych. W przypadku ekstrakcji antocyjanów z owoców jagodowych stosuje się dodatek pektynazy lub mieszanin enzymów zawierających pektynazy, celulazy, hemicelulazy. Te same enzymy są również stosowane w celu poprawy wydajności wytlączania soku z owoców. Zastosowanie hydrolaz zwiększa wydajność dyfuzji i rozpadu komórek dzięki rozluźnieniu struktury ścian komórkowych. Z drugiej strony, komercyjnie dostępne enzymy często mają aktywności poboczne powodujące hydrolizę a tym samym obniżenie zawartości ekstrahowanych substancji. W związku z tym, często niezbędnym etapem optymalizacji procesu ekstrakcji jest sprawdzenie wpływu dodatku różnych enzymów na wydajność procesu [77–79]. Niektóre enzymy stosowane do ekstrakcji lub wytlączania soku mogą również modyfikować charakterystyczny dla danego owoców profil antocyjanów. Przyczyną tego niekorzystnego zjawiska jest hydroliza antocyjanidyn glikozylowanych niektórymi cukrami (np. arabinozą) [80]. Zastosowanie enzymów może usprawnić również proces dalszej obróbki ekstraktu dzięki obniżeniu lepkości, poprawieniu klarowności i ułatwieniu filtracji ekstraktu [81,82].

#### **2.4. Metody analizy antocyjanów**

Do analizy ilościowej i jakościowej antocyjanów powszechnie stosuje się metody spektrofotometryczne i HPLC. Wysokie wartości molowego współczynnika absorpcji, charakterystyczne widmo UV-Vis antocyjanów oraz zmiana widma zależnie od pH roztworu ułatwiają spektrofotometryczne oznaczanie zawartości antocyjanów [62,83,84]. Przykładowe widmo antocyjanów w pH 4,5 i 1,0 przedstawiono na Rysunku 3. Charakterystyczne maksima znajdują się przy ok. 520 i ok. 280 nm. Do analiz ilościowych wykorzystuje się maksimum przy 520 nm. W spektrofotometrycznej metodzie różnicowej wykonuje się pomiar absorpcji

wodnych roztworów zawierających antocyjany o pH 1,0 i pH 4,5. Absorbancję każdego z roztworów należy zmierzyć przy dwóch długościach fali  $\lambda=520$  nm. i  $\lambda=700$  nm. Niespecyficzną dla antocyjanów absorbancję przy 700 nm., należy odjąć od typowej dla tych związków absorbancji przy 520 nm. Następnie zawartość antocyjanów oblicza się uwzględniając rozcieńczenie próbki, molowy współczynnik absorbancji i masę molową substancji zastosowanej do wyrażenia wyniku. Wyniki najczęściej są przeliczane na 3-O-glukozyd cyjanidyny, ale można je także przeliczyć na dowolną substancję z grupy antocyjanów [62,83].



Rysunek 3. Widmo antocyjanów na przykładzie ekstraktu z owoców bzu czarnego. Czarna linia – w roztworze o pH 1,0. Czerwona linia – w roztworze o pH 4,5.

W monografii owoców borówki czarnej Farmakopei Polskiej XII (odpowiednik Farmakopei Europejskiej X), znajduje się opis metody wykorzystującej molowy współczynnik absorbancji chlorku 3-O-glukozydu cyjanidyny w 0,1% roztworze HCl w metanolu i jedną długość fali  $\lambda=528$  nm.

Do chromatograficznego oznaczania zawartości antocyjanów wykorzystuje się kolumny do HPLC w odwróconej fazie (RP-HPLC) typu C18 lub fenyl-heksyl [85,86]. Nietypową metodą alternatywną może być chromatografia oddziaływań hydrofilowych (HILIC). Metoda ta nadaje się do oznaczania zawartości antocyjanów w surowcach o różnym typie glikozylacji antocyjanów, co jest trudne w przypadku RP-HPLC. HILIC nie nadaje się do identyfikacji antocyjanów glikozylowanych izomerami cukrów. W metodzie HILIC taki sam

czas retencji będą miały np. 3-glukozyd- i 3-galaktozyd cyjanidyny, które z kolei łatwo rozdzielają się za pomocą RP-HPLC [87].

Do oznaczania antocyjanów stosuje się fazy ruchome o niskim pH, co umożliwia utrzymanie tych substancji w formie najbardziej stabilnej i posiadającej najwyższą absorpcję przy długości fali około 520 nm. [86]. Powszechnie stosowanymi detektorami w analizie antocyjanów metodą HPLC są detektory UV-VIS i spektrometry mas. Charakterystyczne widmo UV-VIS ułatwia identyfikację pików antocyjanów w przypadku stosowania detektora DAD. Utrudnieniem w identyfikacji konkretnych substancji z tej grupy jest utrudniona dostępność wzorców wielu antocyjanów występujących w przyrodzie. Pomocne może być zastosowanie detektora MS, który daje istotne informacje dotyczące masy cząsteczkowej i fragmentacji poszczególnych jonów. Niestety, takie detektory nie zawsze umożliwiają stuprocentową identyfikację substancji, ponieważ niektóre antocyjany mają takie same widma masowe. W przypadku obu rodzajów detektorów pomocne może być porównanie z charakterystycznym profilem chromatograficznym konkretnych surowców roślinnych [88,89]. W niektórych surowcach roślinnych (np. owocach borówki czarnej) występują liczne substancje z grupy antocyjanów. Z powodu problemów spowodowanych kosztami i dostępnością wzorców, powszechnie stosowaną praktyką jest sumowanie wszystkich pików tych substancji i przeliczanie na zawartość jednego antocyjanu, którym najczęściej jest 3-glukozyd cyjanidyny [89–91].

### **3. Metody separacyjne**

Rozpuszczalniki stosowane do ekstrakcji antocyjanów mają ograniczoną selektywność, dodatkowo, soki i ekstrakty owocowe charakteryzują się wysoką zawartością mono- i disacharydów oraz kwasów organicznych. Substancje te odpowiadają za niską temperaturę zeszklenia (z *ang.* glass transition temperature – Tg) takich ekstraktów. Ponadto, wysuszony, nieoczyszczony ekstrakt przykleja się do ścianek suszarki rozpyłowej lub do pasów suszarni próżniowej, co uniemożliwia wydajne wysuszenie takiego ekstraktu. W celu wydajnego suszenia ekstraktu niezbędne jest obniżenie zawartości cukrów w suszonym płynie lub dodanie znacznej ilości nośnika, np. maltodekstryny. Dodanie, przed suszeniem, nośnika powoduje dalsze obniżenie zawartości polifenoli w uzyskanym proszku [92–94]. Z wyżej wymienionych przyczyn, w celu oczyszczenia takich ekstraktów stosuje się metody separacyjne – chromatograficzne [92,95] lub membranowe [96–98].

### 3.1. Chromatografia preparatywna i jej zastosowanie do separacji polifenoli

W kolumnowej chromatografii preparatywnej wykorzystuje się kolumny zapakowane złożami, przez które pompowana jest nadawa, a następnie rozpuszczalniki. Podobnie jak w HPLC, separacja może odbywać się w odwróconym lub normalnym układzie faz. W układzie normalnym faza stacjonarna jest polarna (np. krzemionka), a fazy ruchome są niepolarne. W przypadku układu odwróconego faza stacjonarna jest niepolarna (np. C18 lub kopolimer styren-diwinylbenzen), a fazy ruchome są polarne. W drugim przypadku, powszechnie stosowanym w przemyśle spożywczym, niepolarne grupy funkcyjne substancji oddziałują z niepolarnym złożem. Z tego powodu związki najbardziej polarne nie oddziałują ze złożem i ulegają elucji z kolumny w pierwszej kolejności – w trakcie podawania ekstraktu na kolumnę i przemywania. W dalszej kolejności elucji ulegają substancje coraz mniej polarne, które związały się z żywicą. Te związki są eluowane pod wpływem rozpuszczalnika organicznego (np. metanol, etanol) podawanego na kolumnę w czystej postaci lub w formie mieszaniny z wodą [99,100].

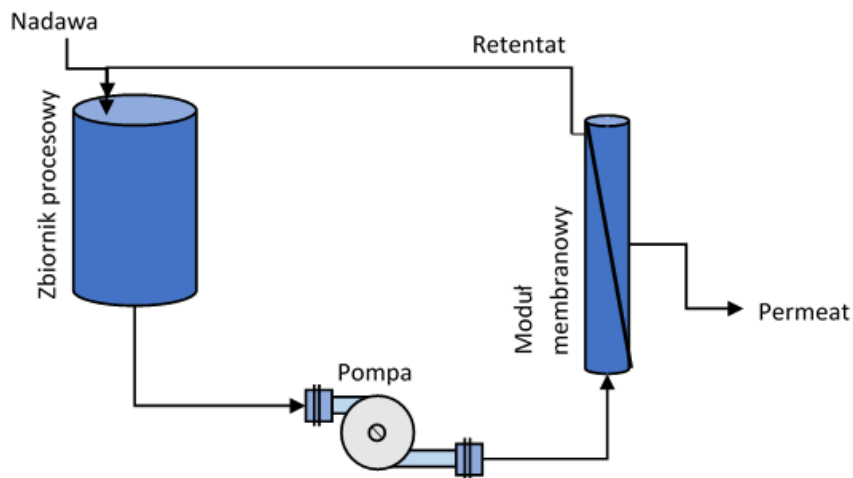
Pierwszym etapem chromatografii preparatywnej jest adsorpcja. W zastosowaniach przemysłowych duże znaczenie ma zdolność do zaadsorbowania możliwie największej ilości poddawanych separacji substancji w przeliczeniu na objętość złoża. Wyższa zdolność adsorpcyjna złoża umożliwia obniżenie kosztów produkcji. Kolejnym etapem jest przemywanie, w czasie którego odmywane są substancje niezwiązane ze złożem. W skali przemysłowej na tym etapie najczęściej używa się wody. Następnym etapem procesu to elucja, w czasie której wymywane są substancje związane ze złożem. Zależnie od założeń procesu, elucję można przeprowadzić za pomocą jednego stężenia rozpuszczalnika organicznego w roztworze elucyjnym, gradientu skokowego lub gradientu liniowego [99,101,102]. Preferowanym rozpuszczalnikiem do elucji w przemyśle spożywczym jest etanol. W porównaniu z innymi rozpuszczalnikami organicznymi, etanol jest stosunkowo bezpieczny i dopuszczony do zastosowań spożywczych. Może być recykulowany i używany wielokrotnie [103,104]. Dodatkowo, po każdym cyklu, lub co określoną liczbę cykli, co zwykle należy określić eksperymentalnie, można prowadzić regenerację. Do regeneracji można używać rozpuszczalników o wyższej sile elucyjnej od roztworu elucyjnego, a także roztworów wodorotlenków i kwasów. W przypadku polimerowych żywic adsorpcyjnych, w celu regeneracji powszechnie używa się roztworu wodorotlenku sodu lub izopropanolu o wysokim stężeniu. Ostatnim etapem procesu jest przygotowanie kolumny wypełnionej złożem do kolejnego cyklu, czyli kondycjonowanie. Na tym etapie złoże jest przemywane rozpuszczalnikiem nadawy, np. wodą [104,105].

Złoża używane w chromatografii procesowej możemy podzielić na organiczne i nieorganiczne. Wśród nieorganicznych wyróżniamy złoża na bazie węgla aktywnego, krzemionki lub tlenku glinu. Druga grupa to polimery organiczne – niepolarne to przede wszystkim żywice zbudowane z polistyrenu usieciowanego diwinylobenzenem. Pośrednią polarność charakteryzują się żywice polimetakrylowe. Polarne są złoża na bazie polisacharydów (np. dekstran, agaroz) [106]. Żywice makroporowate, które są powszechnie używane w skali przemysłowej, oddziałują z zawartymi w nadawie substancjami w różny sposób. Do separacji polifenoli używa się między innymi żywic będących kopolimerami styrenu i diwinylobenzenu (DVB) [95,107–109]. Związki fenolowe zawierają pierścienie benzenowe, które mogą być adsorbowane przez żywicę dzięki oddziaływaniom hydrofobowym oraz oddziaływaniom  $\pi$ - $\pi$  [110]. Do separacji polifenoli używane są również żywice zbudowane z polimerów metakrylowych. W tym przypadku, grupy hydroksylowe polifenoli mogą oddziaływać z takimi żywicami za pomocą wiązań wodorowych. Polifenole są donorami wiązań wodorowych a żywica jest ich akceptorem [111]. Wydajną adsorpcję i desorpcję antocyjanów uzyskiwano również na krzemionce C8 i C18. Wydajność adsorpcji i desorpcji antocyjanów była w przypadku krzemionek nawet wyższa niż pozostałych przetestowanych żywic [92,112]. Wadą takiej metody separacji były niskie przepływy w porównaniu z żywicami polimerowymi. Utrudnia to przeprowadzenie wydajnej separacji w dużej skali [92]. Inną wadą krzemionki C18 jest niska odporność na regenerację w warunkach zasadowych [113]. Z kolei zaletą żywic polimerowych jest ich znacznie niższa cena w porównaniu do krzemionki C18.

### **3.2. Ciśnieniowe procesy membranowe i ich zastosowanie w przemyśle spożywczym**

W przemyśle spożywczym powszechnie używa się takich technik membranowych jak mikrofiltracja (MF), ultrafiltracja (UF), nanofiltracja (NF), odwrócona osmoza (RO). W przypadku procesów ciśnieniowych siłą napędową jest różnica ciśnień po obu stronach membrany. Rozdział składników mieszanin może zachodzić prostopadle do membrany (dead end filtration). Wadą takiego rozwiązania jest duża podatność membrany na blokowanie, z powodu zatrzymywanych przez membranę cząstek nadawy, które odkładają się na jej powierzchni. Cząstki te powodują przyspieszone blokowanie membrany, powodując spadek strumienia permeatu. Ograniczenie tych niekorzystnych zjawisk następuje w przypadku zastosowania filtracji skośnej (*ang.* tangential flow filtration lub cross flow filtration) [114,115] (Rysunek 4).

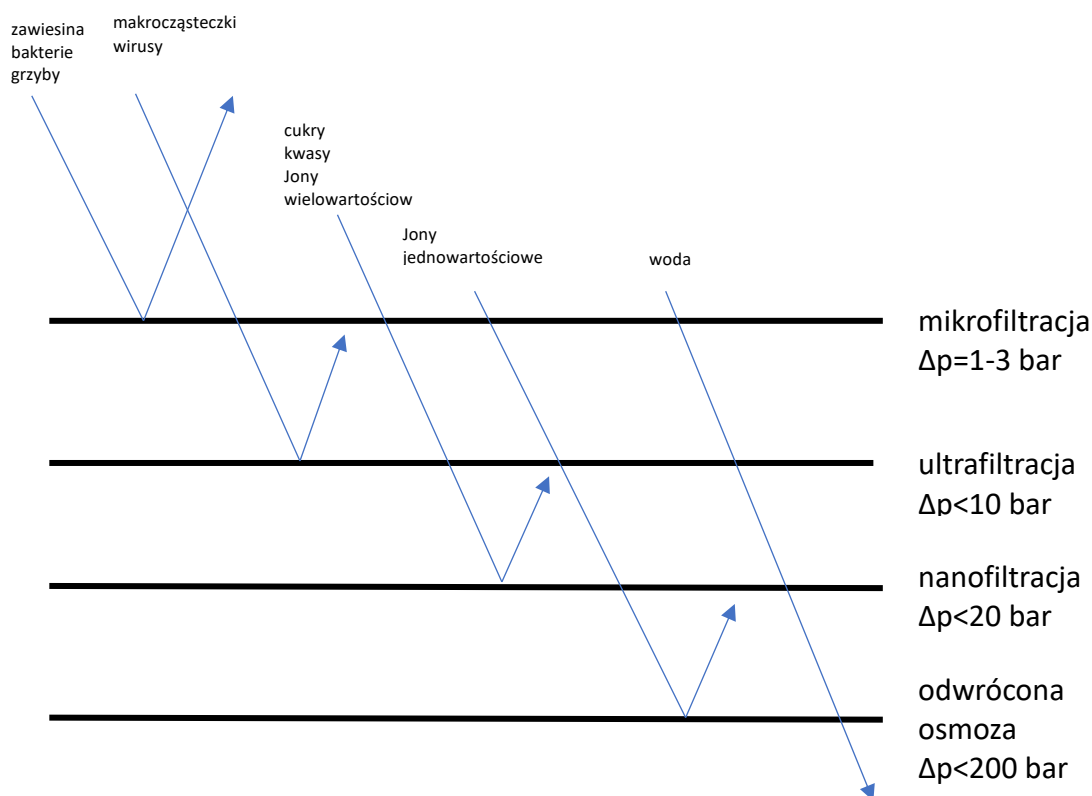




Rysunek 4. Ogólny schemat instalacji membranowej w trybie filtracji skrośnej.

### 3.2.1. Charakterystyka ciśnieniowych procesów membranowych

Klasyfikacja membran i procesów membranowych zależy od wielkości rozdzielanych cząstek jak również stosowanych ciśnień. Podział ten przedstawiono schematycznie na Rysunku 5. Należy zauważyć, że im mniejsze są pory membran, tym większych ciśnień należy używać w trakcie procesu. Podział ten jest umowny i poszczególni autorzy różnią się nieznacznie w zakresie klasyfikacji procesów i membran [116–118].



Rysunek 5. Podział ciśnieniowych technik membranowych ze względu na przepuszczalność dla określonych grup cząstek.

Pory membran używanych w mikrofiltracji mieszczą się w zakresie 0,1-10  $\mu\text{m}$ . Z kolei ciśnienia stosowane w MF mieszczą się w zakresie 1-3 barów. Mikrofiltrację wykorzystujemy w przemyśle do usuwania cząstek stałych, zawieszonych w płynach. Za pomocą MF można oczyścić ciecze z takich cząstek jak resztki mięszo owoców, komórki bakterii, zarodniki i strzępki grzybów. Ten proces jest używany do klaryfikacji i tzw. zimnej pasteryzacji soków, mleka, piwa i innych napojów [118,119]. MF znajduje również zastosowanie w procesie oczyszczania wody, jako etap wstępny przed NF lub RO [120]. Zastosowanie mikrofiltracji przed innymi technikami membranowymi (np. UF i/lub NF) ogranicza niekorzystne zjawisko blokowania powierzchni membrany (foulingu) [121]. Główną zaletą procesu mikrofiltracji jest możliwość przeprowadzenia procesu w niskiej temperaturze. Dzięki temu ogranicza się termiczną degradację substancji niestabilnych w wysokiej temperaturze [122,123]. W przypadku produktów zawierających białka, nie ulegają one denaturacji termicznej w trakcie sterylizacji. Zastąpienie pasteryzacji termicznej przez mikrofiltrację ogranicza również reakcję Maillarda [118,124]. Zastosowanie MF jest również korzystniejsze energetycznie od

pasteryzacji termicznej. Największą wadą mikrofiltracji jest możliwość foulingu membran, powodująca spadek przepływu [122].

Membrany używane do procesu ultrafiltracji mają pory o rozmiarach w granicach 2-100 nm. W związku z mniejszą porowatością niż w przypadku mikrofiltracji stosuje się ciśnienia do około 10 barów [125–127]. Membrany UF zatrzymują makrocząsteczki takie jak wielocukry, białka czy taniny wysokocząsteczkowe, natomiast substancje niskocząsteczkowe penetrują przez membranę. Ultrafiltracja jest stosowana jako metoda oczyszczania wody pitnej. Umożliwia usunięcie bakterii, wirusów, zmętnienia i znacznej części zanieczyszczeń organicznych. W porównaniu z nanofiltracją czy odwróconą osmozą, UF charakteryzuje się niższymi kosztami aparatury i energii [128]. UF stosuje się również do separacji, frakcjonowania i oczyszczania białek z produktu odpadowego powstającego podczas produkcji serów lub kazeiny - serwatki. Dzięki zastosowaniu tego procesu otrzymuje się produkty takie jak koncentraty białek serwatki [129,130]. Ultrafiltracja znajduje zastosowanie jako jeden z etapów oczyszczania ścieków [131] a także jako wstępny etap filtracji przed zastosowaniem NF lub RO. Takie przygotowanie nadawy poprawia wydajność procesu, dzięki ograniczeniu blokowania bardziej zwartych membran [132,133]. UF jest również używana do produkcji ekstraktów roślinnych wzbogaconych w określone grupy substancji chemicznych. Niektórzy producenci ekstraktów roślinnych wytwarzają produkty o wysokiej standaryzacji z zastosowaniem separacji na membranach ultrafiltracyjnych [134].

Kolejnym procesem wchodzącym w skład ciśnieniowych technik membranowych jest nanofiltracja. W tym przypadku pory membran są mniejsze niż w przypadku UF i w związku z tym stosowane ciśnienia są wyższe. Membrany nanofiltrycyjne, oprócz substancji wysokocząsteczkowych, zatrzymują wiele substancji niskocząsteczkowych takich jak cukry, aminokwasy, polifenole a także jony wielowartościowe [120,127]. Jednym z podstawowych parametrów charakteryzujących membrany nanofiltrycyjne jest stopień retencji określonej soli (salt rejection coefficient) [135]. Do zastosowań nanofiltracji zaliczamy oczyszczanie wody pitnej, np. z pozostałości farmaceutyków [135,136], a także jako jeden z etapów oczyszczania ścieków [135,137]. Są także liczne prace eksperymentalne opisujące zastosowanie NF do separacji i zagęszczania ekstraktów roślinnych [97,98,121,138].

Odwrócona osmoza jest procesem, w którym przez membranę przenikają praktycznie wyłącznie cząsteczki rozpuszczalnika. Znaczną część zastosowań odwróconej osmozy stanowi odsalanie wody i wytwarzanie wody oczyszczonej do celów przemysłowych, np. w przemyśle

spożywczym i farmaceutycznym. Ciśnienia wykorzystywane w tym procesie są wyższe niż w NF i sięgają nawet 100 barów [139,140].

### 3.2.2. Najważniejsze parametry i pojęcia charakteryzujące techniki membranowe

Nadawa jest roztworem podawanym na membranę (Rysunek 4). Nadawa na membranie jest rozdzielana na 2 strumienie – permeat (filtrat) i retentat (koncentrat). Permeat jest strumieniem składający się z cząstek penetrujących przez membranę. Z kolei retentat jest strumieniem składającym się z cząstek zatrzymywanych przez membranę. W procesach ciśnieniowych, membrana zatrzymuje cząsteczki zależnie od ich granicznej masy molowej (MWCO - z *ang.* molecular weight cut-off). Jest to masa cząsteczkowa, przy której co najmniej 90% cząstek jest zatrzymywanych na danej membranie ( $R \geq 90\%$ , Równanie 1). MWCO jest jednym z podstawowych parametrów opisujących membranę w procesach ciśnieniowych. Współczynnik retencji jest stosunkiem stężeń zatrzymanego składnika w permeacie ( $C_p$ ) i nadawie ( $C_n$ ). Oblicza się go z wzoru przedstawionego Równaniem 1:

$$R = \left(1 - \frac{C_p}{C_n}\right) \times 100\% \quad (1)$$

R - współczynnik retencji,

$C_p$  – stężenie substancji w permeacie,

$C_n$  – stężenie substancji w nadawie.

Jeżeli wartość współczynnika retencji wynosi 100% to membrana zatrzymuje 100% danej substancji. Natomiast, jeżeli wartość tego współczynnika wynosi 0% to membrana przepuszcza 100% danej substancji [141,142].

Strumień permeatu – objętość powstającego permeatu w przeliczeniu na jednostkę powierzchni membrany w określonym czasie. Wyrażany jest w  $L \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}$  i jest obliczany z wykorzystaniem Równania 2.

$$J = \frac{V}{A \cdot t} \quad (2)$$

J – strumień permeatu,

V – objętość powstającego permeatu,

A – powierzchnia membrany,

T – czas.

W czasie trwania procesów membranowych zachodzi zjawisko polaryzacji stężeniowej. Jest to zjawisko polegające na zwiększeniu lub zmniejszeniu stężenia określonych cząsteczek lub cząstek w warstwie przylegającej do membrany, spowodowane ich selektywnym transportem przez membranę. Polaryzacja stężeniowa przyczynia się do spadku szybkości filtracji w trakcie trwania procesu [116].

Główną przyczyną spadku przepływu w technikach membranowych jest także blokowanie powierzchni membrany. Zapobieganie blokowaniu membrany polega na odpowiednim przygotowaniu nadawy, np. wstępnej filtracji, jak również odpowiednio częstym myciu membrany [116].

### **3.2.3. Rodzaje membran stosowanych w procesach ciśnieniowych**

W procesach membranowych stosuje się membrany ceramiczne lub wykonane z syntetycznych polimerów. Membrany ceramiczne są zbudowane z tlenków metali, np. tlenku tytanu (IV), tlenku cyrkonu (IV). Membrany ceramiczne zazwyczaj stosowane są w przemyśle w trudnych warunkach, takich jak wysoka temperatura, wysokie lub niskie pH albo konieczność używania żrących środków myjących, ponieważ membrany ceramiczne są bardziej od polimerowych odporne na czynniki chemiczne i wysoką temperaturę. Zaletami membran ceramicznych jest ich wysoka trwałość i wytrzymałość mechaniczna. Wadą membran ceramicznych jest ich stosunkowo wysoka cena. Jednak w ostatnich latach opracowuje się tańsze metody wytwarzania membran ceramicznych, co zwiększa ich potencjał komercyjny [143,144]. Aktualnie wytwarzane membrany ceramiczne posiadają strukturę asymetryczną składającą się z makroporowatej warstwy wzmacniającej i mezo- lub mikroporowatej warstwy separacyjnej. Membrany mają charakterystyczną strukturę asymetryczną, którą uzyskuje się poprzez osadzanie cząstek o zmniejszających się rozmiarach w warunkach spiekania w wysokiej temperaturze. W ten sposób powstaje ciągła i porowata warstwa [143,145].

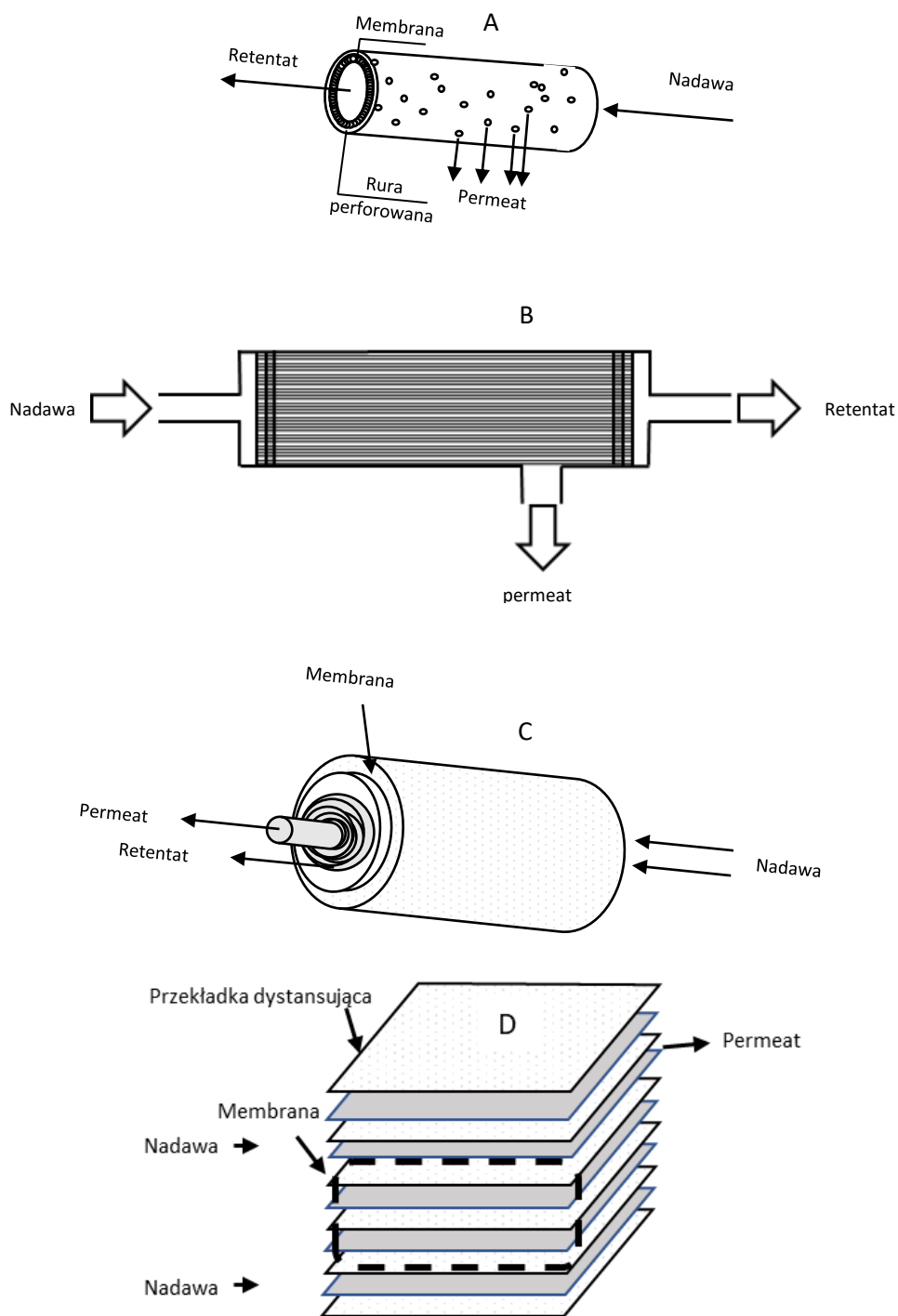
Membrany polimerowe mają duże znaczenie na rynku, głównie ze względu na niską cenę i wysoką wydajność. Rynek membran polimerowych do NF i RO jest zdominowany przez membrany typu cienkiego filmu kompozytowego (TFC). Membrany tego typu zbudowane są głównie z aromatycznego poliamidu (PA). Jednakże wadą tego polimeru jest brak odporności na chlor. Membrany z PA tracą swoją wydajność w obecności około 1000 ppm chloru [146]. Podobnie jak w przypadku membran ceramicznych, membrany TFC zbudowane są z cienkiej selektywnej warstwy na porowatym suporcie, odpowiadającym za wytrzymałość mechaniczną

membrany [147]. Do produkcji membran polimerowych używa się również innych polimerów takich jak octan celulozy, polieterosulfon, polisulfon, czy polifluorek winylidenu (PVDF).

Ze względu na kształt membran w modułach, wyróżniamy moduły rurowe, kapilarne, włókna kanalikowe, spiralne i płaskie (Rysunek 6). Moduły rurowe zbudowane są z rurek o średnicy 5-25 mm (Rysunek 6 A). Ze względu na stosunkowo dużą średnicę wewnętrzną są one w stanie efektywnie filtrować nadawę zawierającą stosunkowo duże cząstki stałe. Duża średnica wewnętrzna ułatwia też mycie membran za pomocą metod chemicznych i mechanicznych. Moduły rurowe pracują w przepływie turbulentnym, więc potrzebują wydajnych pomp. Charakteryzują się najmniejszym stosunkiem powierzchni membrany do objętości modułu. Moduł kapilarny (Rysunek 6 B) składa się z dużej liczby kapilar, o średnicy ok 0,4-1 mm, w formie pęku umieszczonego w cylindrycznej obudowie. Moduł taki jest uszczelniony na obu końcach żywicą epoksydową, kauczukiem silikonowym albo poliuretanem. Membrany, w tego typu modułach, nie wymagają warstwy podtrzymującej, jak moduły rurowe. Moduły z włókien kanalikowych (Rysunek 6 B) zbudowane są w podobny sposób jak moduły kapilarne, ale średnica włókien jest mniejsza i wynosi poniżej 0,4 mm.

W modułach spiralnych (Rysunek 6 C) membrana jest zwinięta wokół perforowanej rury zbiorczej służącej do zbierania permeatu. Poszczególne zwoje membrany są oddzielone od siebie przekładkami dystansowymi. Membrany spiralne charakteryzują się przepływem turbulentnym. Mają wysoki stosunek powierzchni do objętości. Wadą tego typu membran jest łatwe uleganie zablokowaniu przez cząstki zawieszone w nadawie, co prowadzi do częściowego zmniejszenia przepływu. Membrany tego typu wymagają stosunkowo czystej nadawy i często wymagana jest dokładna filtracja wstępna.

W modułach płaskich membrany są ułożone równolegle do siebie i przedzielone przekładkami dystansowymi. Membrany są zamknięte w obudowie przypominającej prasę filtracyjną [140,141].

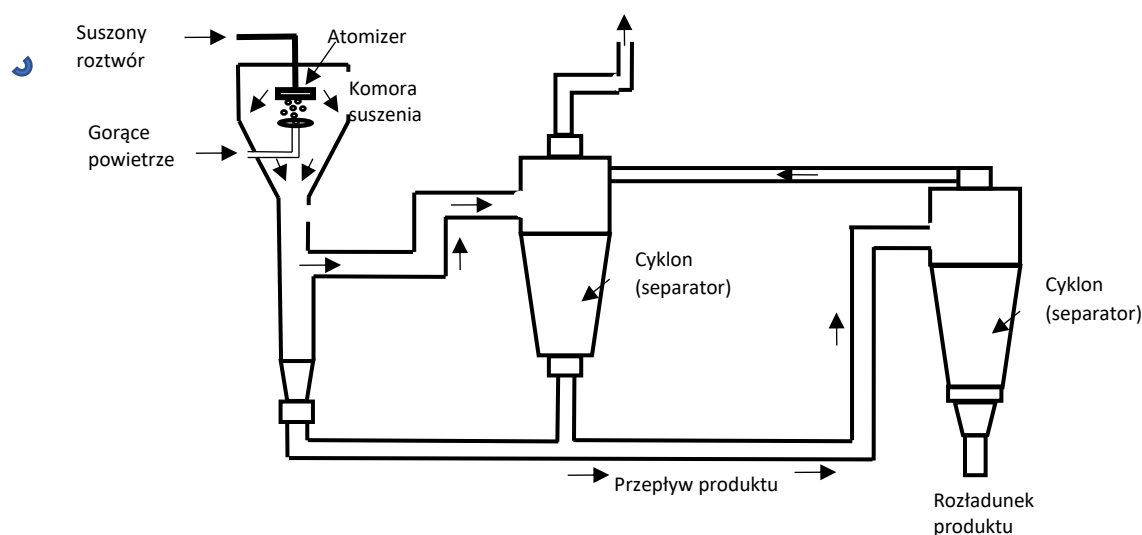


Rysunek 6. Rodzaje modułów membranowych: A - Moduł rurowy, B - Moduł kapilarny/z włóknami kanalikowymi, C - Moduł spiralny, D – Moduł płaski.

Opracowano na podstawie [141].

#### 4. Suszenie rozpyłowe ekstraktów roślinnych

Ekstrakty roślinne w formie płynnej, z powodu wysokiej aktywności wody, charakteryzują się ograniczoną trwałością mikrobiologiczną i chemiczną. Suszenie rozpyłowe zwiększa możliwość ich koncentracji. Niestety, nie wszystkie produkty można wysuszyć w stanie „natywnym”, czyli bez dodatku nośnika. Produkty o wysokiej zawartości cukrów prostych charakteryzują się niską temperaturą zeszklenia, co uniemożliwia wysuszenie (zarówno próżniowe jak i rozpyłowe) takich produktów. Rozwiązaniem tego problemu jest dodatek substancji wysokocząsteczkowych, np. wielocukrów, które podwyższają temperaturę zeszklenia. Wadą takiego rozwiązania jest obniżenie zawartości ekstraktu w gotowym proszku [148,149].



Rysunek 7. Schemat suszarni rozpyłowej. Opracowano na podstawie [150].

Uproszczony schemat suszarni rozpyłowej przedstawiono na Rysunku 7. Suszenie rozpyłowe polega na otrzymaniu proszku z płynnego surowca dzięki rozpyleniu cieczy do formy drobnych kropelek i szybkim wysuszeniu w strumieniu gorącego powietrza. Rozpylenie suszonej cieczy zwiększa powierzchnię odparowania, co umożliwia bardzo szybkie wysuszenie płynu. Kontakt z wysoką temperaturą jest krótkotrwały, co ogranicza degradację labilnych substancji. Korzystny jest również fakt, że występuje tutaj chłodzący efekt odparowania, dzięki któremu niemal całe dostarczone ciepło jest zużywane do odparowania [151].

Suszenie rozpyłowe zachodzi w trakcie trzech głównych etapów. Pierwszym z nich jest atomizacja suszonej cieczy, która zachodzi zwykle w rozpylaczach ciśnieniowych lub odśrodkowych. Jest to kluczowy etap suszenia rozpyłowego. W rozpylaczu odśrodkowym



suszony płyn wprowadzany jest w centrum szybko obracającego się dysku i spływa po jego powierzchni na obrzeża, a podczas opuszczania dysku rozpada się na kropelki. Do zalet rozpylaczy rotacyjnych możemy zaliczyć brak problemów z blokowaniem przepływu i możliwość kontroli wielkości kropli dzięki regulacji prędkości obrotowej dysku. Z kolei do wad tego typu rozpylaczy zaliczamy wysoki koszt i utrudnione stosowanie z cieczami o wysokiej lepkości [151,152]. W rozpylaczach pneumatycznych rozpylanie odbywa się za pomocą dysz i mogą być one używane do suszenia roztworów o różnej lepkości i jednorodności a także zawiesin. Otrzymywane tą metodą proszki mają stosunkowo małe wymiary i są mniej jednorodne niż w przypadku suszarni z rozpylaczami dyskowymi [151,153]. Odparowanie odbywa się w komorze suszenia, która jest największym elementem suszarni rozpyłowej. Proszek z komory jest kierowany do separatorów (cyklonów), w których następuje rozdzielanie strumienia powietrza od proszku [153].

Suszenie rozpyłowe jest najbardziej powszechną techniką suszenia w przemyśle spożywczym. Charakteryzuje się wysoką wydajnością i niskim kosztem (ok 30-50 razy mniej niż liofilizacja) [154,155]. Dzięki bardzo krótkiemu kontaktowi z wysoką temperaturą, nadaje się do suszenia substancji termolabilnych, takich jak antocyjany [150,155],  $\beta$ -karoten [154], enzymy [156] oraz białka serwatki [157].

## 5. CEL PRACY

Ekstrakty z owoców jagodowych wykazują właściwości prozdrowotne, działając korzystnie w szczególności na układ krążenia (obniżają ciśnienie krwi, wzmacniają naczynia krwionośne, regulują poziom cholesterolu). Właściwości biologiczne ekstraktów z owoców jagodowych wynikają w znacznej mierze z właściwości przeciwutleniających i przeciwzapalnych antocyjanów. Ekstrakty i koncentraty z tego typu owoców są również stosowane jako naturalny, prozdrowotny barwnik spożywczy mogący zastąpić niektóre barwniki syntetyczne.

Ekstrakty z owoców lub wyłoków z aronii, bzu czarnego i borówki czarnej są zwykle standaryzowane na wysoką zawartość antocyjanów. Preferowaną formą ekstraktów standaryzowanych przeznaczoną do długotrwałego przechowywania jest forma sucha. Suchy ekstrakt dzięki niskiej aktywności wody, zapewnia wysoką stabilność chemiczną i mikrobiologiczną. Bezpośrednie suszenie ekstraktów nie zawsze jest możliwe. Owoce jagodowe cechują się wysoką zawartością cukrów i kwasów organicznych, które z powodu niskiej temperatury zeszklenia uniemożliwiają wydajne wysuszenie ekstraktu bez dodatku dużej ilości nośnika. Ponadto, rozpuszczalniki stosowane do ekstrakcji charakteryzują się ograniczoną selektywnością. Z tego powodu, w celu wyprodukowania ekstraktu o wysokiej zawartości antocyjanów nie wystarczy samo przeprowadzenie wydajnej ekstrakcji, a następnie zagęszczanie i suszenie ekstraktu.

Celem badań, przedstawionych w niniejszej rozprawie, było opracowanie technologii produkcji suchych ekstraktów roślinnych z owoców jagodowych (aronii, bzu czarnego oraz borówki czarnej), standaryzowanych na wysoką zawartość antocyjanów, do zastosowania w produkcji żywności funkcjonalnej o wysokiej jakości, wykorzystywanej w suplementach diety oraz jako barwnik spożywczy.

Realizacja tak postawionego głównego celu pracy wymagała przeprowadzenia badań zarówno w skali laboratoryjnej jak i przemysłowej, obejmujących etap zoptymalizowanej ekstrakcji oraz efektywną separację umożliwiającą usunięcie substancji utrudniających suszenie z jednoczesnym wzbogaceniem ekstraktu w antocyjany i inne polifenole. W pracy założono przeprowadzenie etapu ekstrakcji z wykorzystaniem różnego rodzaju ekstrahentów, mając na uwadze zarówno efektywność jak i efekt ekonomiczny procesu. Do szczegółowego badania etapu separacji wytypowano dwie techniki: chromatografię preparatywną z wykorzystaniem żywic oraz ciśnieniowe techniki membranowe. Określono także optymalne parametry procesu suszenia ekstraktów.

Zbadanie efektywności procesów w skali w skali laboratoryjnej umożliwiło następnie opracowanie założeń technologicznych do skali produkcyjnej. Szczegółowe zbadanie ekstrakcji i separacji antocyjanów z owoców jagodowych uzupełniło też wiedzę naukową dotyczącą właściwości ekstraktów oraz metod separacyjnych, w szczególności membranowych technik separacyjnych.

Dodatkowo, określono w warunkach *in vitro*, wybrane właściwości biologiczne suchych ekstraktów, opracowanych w ramach niniejszej rozprawy. Zbadano właściwości przeciwzapalne i przeciwutleniające ekstraktu z aronii z użyciem makrofagów RAW 264.7. Zbadano również właściwości cytotoksyczne ekstraktów z owoców bzu czarnego, wobec różnych linii komórek nowotworowych. Ponadto, przedyskutowano stymulację proliferacji nienowotworowych, jednojądrzastych komórek krwi obwodowej, przez suche ekstrakty z owoców bzu czarnego.

### **III. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA**

#### **6. Materiały i metody**

##### **6.1. Surowce roślinne**

Mrożone wytloki z owoców aronii zakupiono w firmie Rauch Polska Sp. z o.o. (Przeworsk, Polska). Mrożone owoce bzu czarnego, aronii i borówki czarnej wykorzystane do badań w skali laboratoryjnej kupiono z firmy Cajdex Spółka z o.o. Spółka Komandytowa (Łódź, Polska). Suszone wytloki z owoców bzu czarnego otrzymano od firmy Frunutex Sp. z o.o. (Lublin, Polska).

##### **6.2. Odczynniki i wzorce**

Kwasy chlorogenowy, 3-glukozyd, 3-galaktozyd i 3-sambubiozyd cyjanidyny kupiono od firmy PhytoLab GmbH & Co. KG (Dutendorfer, Niemcy). Mieszanina 3-monoglikozydów cyjanidyny zawierająca: glukozyd, galaktozyd i arabinozyd została kupiona z firmy Polyphenols AS (Sandnes, Norwegia). (+)-katechinę kupiono z firmy Extrasynthese (Lyon, Francja). Acetonitryl, kwas mrówkowy, kwas trifluorooctowy, metanol, kwas chlorowodorowy i węglan sodu zostały kupione z firmy VWR VWR International Poland Sp. z o.o. (Gdańsk, Polska). Odczynnik Folina-Ciocalteu został zakupiony w firmie Chempur Marcin Piątek (Piekary Śląskie, Polska). Wszystkie odczynniki i rozpuszczalniki były w jakości czda. lub HPLC.

##### **6.3. Surowce chemiczne**

Kwas fosforowy spożywczy 75% kupiono od firmy Donauchem (Rokietnica, Polska). Kwas cytrynowy (monohydrat) oraz kwas jabłkowy (D, L) kupiono od firmy Brenntag Polska Sp. z o. o. (Kędzierzyn-Koźle, Polska). Surowce chemiczne były w jakości spożywczej, są więc traktowane jako surowce, a nie jako odczynniki chemiczne.

##### **6.4. Metody preparatywne**

###### **6.4.1. Ekstrakcja antocyjanów**

###### **Skala laboratoryjna**

Do prób ekstrakcji antocyjanów odważano 40 g surowca roślinnego, który zalewano odpowiednim rozpuszczalnikiem i ekstrahowano na łaźni wodnej z wytrząsaniem (WB 16N,

Laboplay, Bytom, Polska). Mrożone owoce przed ekstrakcją rozdrabniano w młynku do owoców. Wytłoki ekstrahowano bez dodatkowego rozdrobnienia. Jeżeli nie podano inaczej, surowce ekstrahowano przez dwie godziny, zalewając wytłoki lub owoce za pomocą 200 mL ekstrahenta. W celu przygotowania ekstraktów do adsorpcji na żywicach chromatograficznych używano 2 kg rozdrobnionego surowca roślinnego i 10 L odpowiedniego ekstrahenta. Celem poprawienia wydajności ekstrakcji, wprowadzano drugi stopień ekstrakcji za pomocą 5 L ekstrahenta przez 1 godzinę. Do ekstrakcji zastosowano laboratoryjny ekstraktor, skonstruowany przez firmę Megan s. c. (Gliwice, Polska). Ekstraktor był wyposażony w szklany zbiornik o objętości 15 L z płaszczem grzejnym, termostat cyrkulacyjny TIP200 (WSL Sp. z o. o., Gliwice, Polska) oraz pompę M35 PP EPDM (Watek s.r.o., Ledec nad Sázavou, Czechy) służącą do cyrkulacji ekstraktu. Próbkę przed podaniem na kolumnę wypełnioną żywicą adsorpcyjną filtrowano za pomocą tkaniny bawełnianej a następnie bibuły jakościowej średniej (Avantor Performance Materials Poland S. A., Gliwice, Polska).

### Skala produkcyjna

Do ekstrakcji w skali produkcyjnej wykorzystano ekstraktory o objętości 6000 L (Zhejiang Wenxiong Machine Valve Co., Ltd., Wenzhou, Chiny) z mieszadłem, zbudowane ze stali kwasoodpornej 316L (Rysunek 8).



Rysunek 8. Ekstraktory zastosowane do testów w skali produkcyjnej.

Do separacji ekstraktu od złoża poekstrakcyjnego zastosowano dekanter Z 32-3/401 (Flottweg, Vilsbiburg, Niemcy). Do filtracji ekstraktu przed podaniem na kolumnę oraz przed badaniami z wykorzystaniem technik membranowych wykorzystano prasę filtracyjną 6-płytkową firmy Colombo Filters And Gaskets Srl (Rescaldina, Włochy).

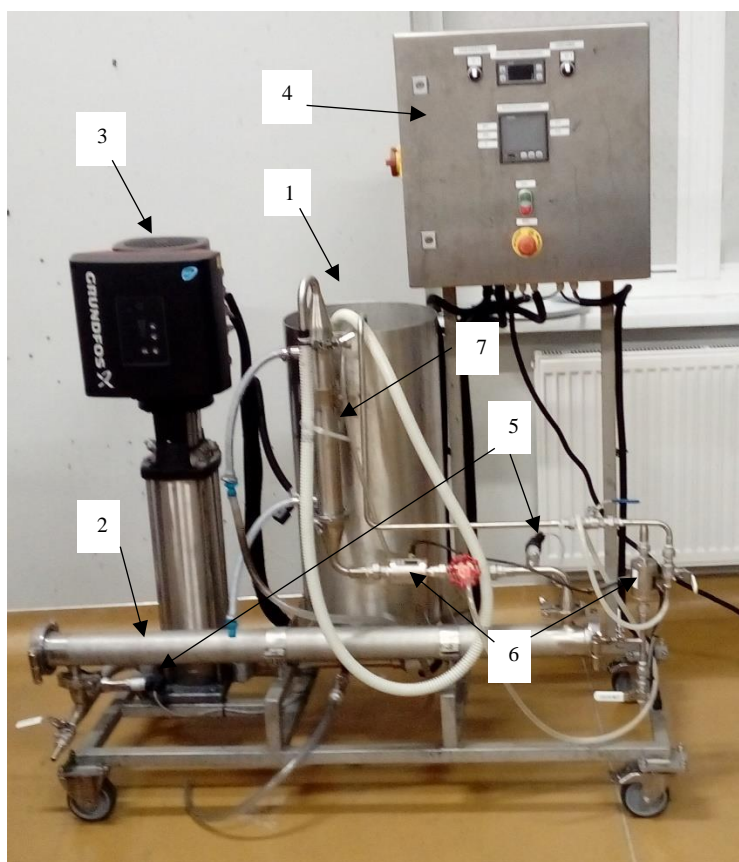
#### 6.4.2. Techniki membranowe

Do badania separacji z wykorzystaniem membran ceramicznych wykorzystano laboratoryjną instalację skonstruowaną w firmie Intermasz Sp. z o. o. (Września, Polska), przedstawioną na Rysunku 9. Elementy stykające się z produktem wykonano ze stali kwasoodpornej (AISI 316L), pozostałe elementy wykonano ze stali nierdzewnej (AISI 304). Instalacja zawierała zbiornik procesowy o pojemności 3L. Do cyrkulacji retentatu służyła pompa magnetyczna zębata o nominalnym wydatku ok.  $450 \text{ L h}^{-1}$  przy ciśnieniu 0,4 MPa. Membrana umieszczona była w module filtracyjnym o długości 600 mm. Instalacja wyposażona była w 2 rotametry oraz 2 manometry umożliwiające kontrolę parametrów procesowych.



Rysunek 9. Laboratoryjna instalacja stosowana do badania technik membranowych.  
1 - Zbiornik procesowy, 2 - Moduł membranowy, 3 – Pompa, 4 - Panel sterujący,  
5 – Manometry, 6 – Rotametry.

Do badania separacji z użyciem membran polimerowych zastosowano pilotażową instalację wykonaną w firmie Chemipoz Sp. z o. o. (Poznań, Polska), przedstawioną na Rysunku 10. Instalacja wykonana była ze stali kwasoodpornej AISI 316L (elementy kontaktujące się z produktem) oraz stali nierdzewnej AISI 304 (pozostałe elementy). Instalacja zawierała zbiornik o pojemności 50 L. Do cyrkulacji retentatu służyła pompa CRNE 1-23 A-P-A-E-HQQE (Grundfos Group, Bjerringbro, Dania) o wydajności nominalnej  $3,5 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ . Instalacja była wyposażona w 2 przepływomierze, 2 przetworniki ciśnienia, chłodnicę wodną oraz dwie grzałki po 2000 W.



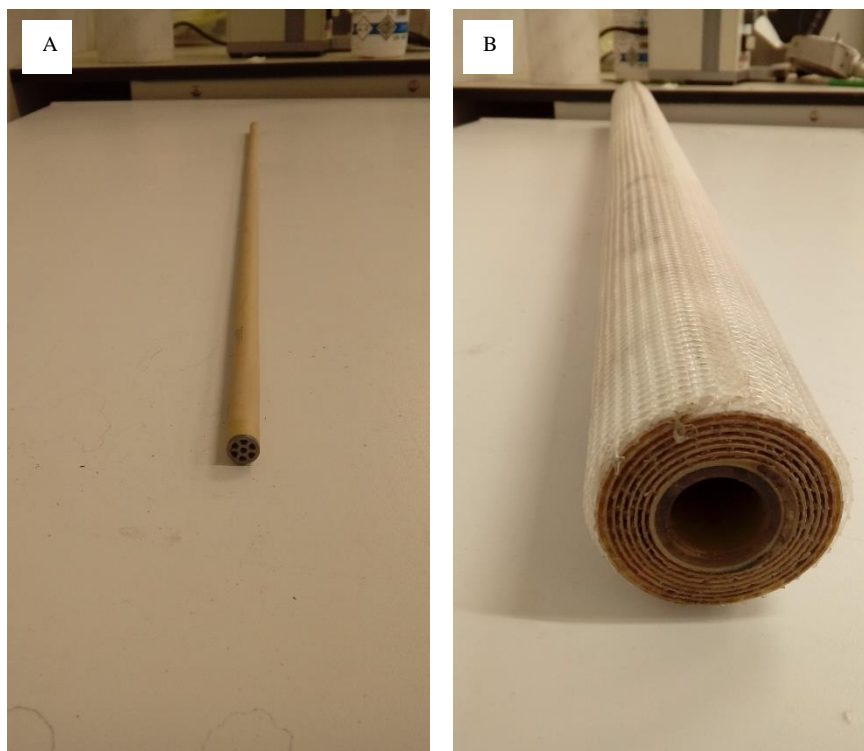
Rysunek 10. Pilotażowa instalacja stosowana do badania technik membranowych.

1 - Zbiornik procesowy, 2 - Moduł membranowy, 3 - Pompa 4 - Panel sterujący, 5 - Manometry, 6 - Przepływomierze, 7 - Chłodnica wodna.

W badaniach zastosowano membrany ceramiczne INSIDE CéRAM™, TAMI Industries (Nyons, Francja) zbudowane z  $\text{TiO}_2$ . O długości 600 mm. i średnicy 10 mm. Membrany jednokanałowe ( $0,45 \mu\text{m}$  oraz 5 kDa) miały powierzchnię  $0,011 \text{ m}^2$ , natomiast membrany siedmiokanałowe (1 i 3 kDa), charakteryzowały się powierzchnią wynoszącą

0,032m<sup>2</sup>. Jednokanałowa membrana o MWCO 450 Da miała powierzchnię 0,0125 m<sup>2</sup>. Siedmiokanałową membranę ceramiczną przedstawia Rysunek 11 A.

Zastosowana w pracy spiralna membrana polimerowa XT MAX (Synder Filtration, Vacaville, USA) była zbudowana z PES (polieterosulfonu), miała średnicę 6,35 cm, długość 96,5 cm i powierzchnię 2,69 m<sup>2</sup> (Rysunek 11B).



Rysunek 11. Membrana ceramiczna (A) i membrana polimerowa, spiralna (B).

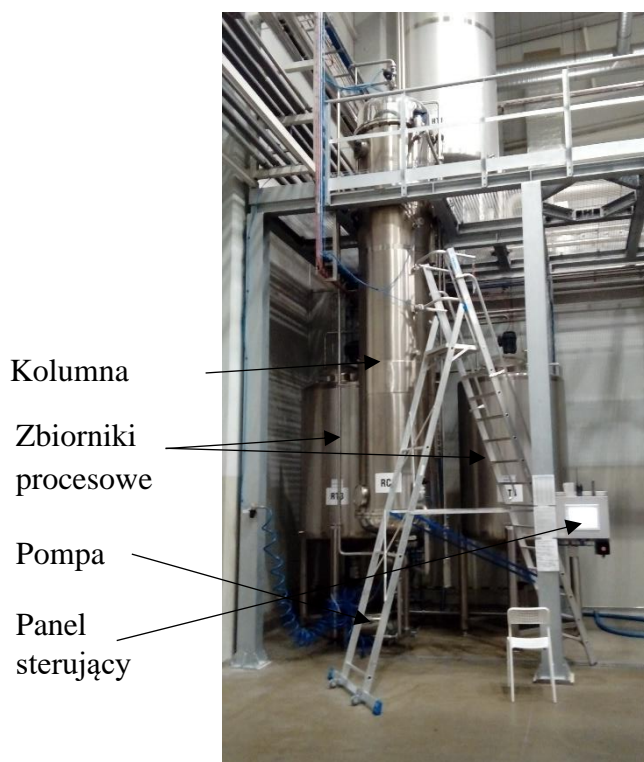
### 6.4.3. Chromatografia preparatywna

Testy żywic zastosowanych do chromatograficznej separacji antocyjanów wykonano na szklanej kolumnie VL 44X500 (Merck KGaA, Darmstadt, Niemcy) o wymiarach 50/4,4 cm. Do wypełnienia kolumny zastosowano próbki żywic adsorpcyjnych, o objętości 500 mL, otrzymane od dystrybutorów. Żywiec Amberlite XAD-16 i Amberlite XAD-7 (Rohm and Haas Company, Filadelfia, USA) otrzymano od firmy Brenntag Polska. Sepabeads SP700, Relite SP41 oraz Diaion HP20 (Resindion S.R.L, Binasco, Włochy) otrzymano od firmy Keyser & Mackay Polska. Żywiec PAD550 i PAD900 (Purolite Corporation, USA) otrzymano od firmy Purolite Polska. Do podawania na kolumnę nadawy i rozpuszczalników używano pompy perystaltycznej firmy Watson Marlow 120S/D1 (Falmouth, Wielka Brytania).



Do testów w skali pilotażowej zastosowano kolumnę o wymiarach 20/90 cm skonstruowaną przez firmę Megan s.c. (Gliwice, Polska). Kolumna miała możliwość regulacji objętości złoża w granicach 10-20 L. Kolumna była wyposażona w dwa dystrybutory przepływu i dolne sito o porowatości 10-40  $\mu\text{m}$  wykonane z PVDF. Do podawania na kolumnę nadawy stosowano pompę perystaltyczną 530S (Watson Marlow, Falmouth, Wielka Brytania). Kolumnę laboratoryjną jak i pilotażową podłączano do detektora Flash 10 DAD wyposażonego w celę pomiarową PLCC3L (Ecom spol. s r.o., Praga, Czechy). Porównanie żywic w skali laboratoryjnej wykonano przy następujących parametrach: kondycjonowanie i adsorpcja – 5 BV/h (objętości żywicy na godzinę); przemywanie - 5 BV h<sup>-1</sup>; elucja – 2 BV h<sup>-1</sup>.

W skali produkcyjnej zastosowano kolumnę firmy Zhejiang Joston Machinery (Zhejiang, Chiny), o wymiarach 800/60 cm i maksymalnej pojemności 2261 L, zapakowaną żywicą do objętości 1100 L. Niewypełniona żywicą część kolumny umożliwiała wykonanie flotacji w celu oddzielenia zanieczyszczeń mechanicznych i uszkodzonych cząstek żywicy (Rysunek 12).



Rysunek 12. Kolumna zastosowana do prac w skali produkcyjnej.

#### **6.4.4. Suszenie rozpyłowe**

Ekstrakty w skali pilotażowej suszono rozpyłowo korzystając z dyskowej suszarni LPG-5 (Changzhou Fengqi Drying Equipment, Changzhou, Chiny) odparowującej nominalnie 5 L wody na godzinę. Ekstrakty suszono w temperaturze wejściowej 170-180°C i temperaturze wyjściowej 85-95°C. Obroty dysku mieściły się w przedziale 300-350 Hz. Suszony płyn podawano za pomocą pompy perystaltycznej w przepływie 70-80 mL min<sup>-1</sup>.

W skali produkcyjnej zastosowano suszarnię rozpyłową dyskową (Changzhou Fengqi Drying Equipment, Changzhou, Chiny) odparowującą 100 kg wody na godzinę. Ekstrakty suszono w temperaturze wejściowej 165-170°C, przy obrotach dysku 258 Hz. Temperatura na wyjściu wynosiła 85°C.

### **6.5. Metody analityczne**

#### **6.5.1. Metody HPLC**

Wszystkie analizy HPLC wykonano przy użyciu systemu Shimadzu Prominence, wyposażonego w autosampler SIL-20AC HT, termostat kolumny CTO-10AS VP i detektor SPD-M20A (Shimadzu Corp., Kioto, Japonia). Zestaw HPLC pracował pod kontrolą oprogramowania LabSolution DB.

#### **Oznaczanie antocyjanów i kwasów fenolowych w owocach aronii i ekstrakcie z owoców aronii metodą HPLC-DAD.**

Wykorzystano metodę analityczną na podstawie pracy Zielińskiej i wsp. z niewielkimi modyfikacjami [158]. Ekstrakty rozpuszczono w mieszaninie metanol/woda 40/60 (v/v) zakwaszonym za pomocą 1% kwasu mrówkowego do uzyskania stężenia ekstraktu ok. 1 mg mL<sup>-1</sup>. Objętość nastrzyku wzorca i próbki wynosiła 10 µL. Rozdziały prowadzono na kolumnie Kinetex Evo C18 5 µm; 250/4,6 mm (Phenomenex, Torrance, Kalifornia, USA) w temperaturze 25°C. Chromatografię prowadzono w gradiencie fazy ruchomej A (4,5% kwas mrówkowy w wodzie v/v) i fazy ruchomej B (acetonitryl). Zastosowano następujący gradient:

- 1) Warunki izokratyczne 0-5 min - 5% B
- 2) Gradient liniowy 5–8% B w 5–15 min
- 3) Gradient liniowy 8–15% B w 15–30 min
- 4) Gradient liniowy 30–33% B w 30–33 min
- 5) Gradient liniowy 33-85% B w 33-37 min

- 6) Gradient liniowy 85-90% w 37-40 min
- 7) Powrót do 5% B w 43 min i kondycjonowanie kolumny w takich samych warunkach do 48 minuty gradientu.

Przepływ wynosił  $1 \text{ mL min}^{-1}$  (0–15 min i 43–48 min) oraz  $0,8 \text{ mL min}^{-1}$  (15–43 min). Zawartość antocyjanów obliczano jako ekwiwalent 3-glukozydu cyjanidyny. Kwasy fenolowe (chlorogenowy i neochlorogenowy) obliczano jako ekwiwalent kwasu chlorogenowego. Antocyjany i kwasy fenolowe zidentyfikowano na podstawie charakterystycznych widm UV-VIS. Antocyjany mają maksymalną absorbancję przy około 520 i około 280 nm. Z kolei kwasy chlorogenowy i neochlorogenowy wykazują maksimum przy 325 nm.

Identyfikację poszczególnych substancji ułatwia fakt, że aronia posiada charakterystyczny profil antocyjanów i kwasów fenolowych ułatwiający identyfikację pików nawet w przypadku braku dostępności wszystkich wzorców.

#### **Oznaczanie antocyjanów i flawonoli w owocach bzu czarnego i ekstrakcie z owoców bzu czarnego metodą HPLC-DAD.**

Naważki ekstraktów po około 25 mg rozpuszczano w 5 mL 2% roztworu HCl w metanolu. Objętość uzupełniano do kreski za pomocą 7,5% roztworu kwasu fosforowego w wodzie. Próbkę filtrowano za pomocą nylonowego filtra strzykawkowego  $0,45 \mu\text{m}$ . Objętość nastrzyku wynosiła  $10 \mu\text{L}$ . Rozdziały prowadzono na kolumnie Kinetex C18;  $5 \mu\text{m}$ ;  $4,6/250 \text{ mm}$  (Phenomenex Torrance, CA, USA). Kolumna była termostatowana w temperaturze  $30^\circ\text{C}$ . Zastosowano gradient, fazy i warunki separacji podane w Farmakopei Amerykańskiej [30]. Zawartość antocyjanów obliczano jako równoważnik 3-glukozydu cyjanidyny. Separację prowadzono w warunkach gradientu dwuskładnikowego. Fazą ruchomą A była mieszanina wody, acetonitrylu i kwasu trifluorooctowego wymieszanych w następujących proporcjach: 19:1:0,06 (v/v). Faza ruchoma B składała się z metanolu, acetonitrylu, wody i kwasu trifluorooctowego w proporcjach: 7:8:5:0,06 (v/v).

Zastosowano następujący gradient:

- 1) Warunki izokratyczne 20% B w 0-5 min
- 2) Gradient liniowy 20–40% B w 5–20 min
- 3) Gradient liniowy 40-90% B w 20-30 min
- 4) Warunki izokratyczne 90% B w 30-35 min
- 5) Powrót do warunków początkowych (20% B) w 36 minucie i kondycjonowanie kolumny w takich samych warunkach do 40 minuty.

Przepływ wynosił 0,8 mL/min. Antocyjany zostały zidentyfikowane na podstawie charakterystycznego widma UV-Vis oraz profilu antocyjanów w Farmakopei Amerykańskiej.

### **Oznaczanie antocyjanów w owocach borówki czarnej i ekstrakcie z owoców borówki czarnej metodą HPLC-DAD.**

Wykorzystano metodę analityczną na podstawie monografii suchego, standaryzowanego ekstraktu z owoców borówki czarnej z Farmakopei Polskiej XII.

0,125 g badanych ekstraktów rozpuszczano w 2% (v/v) roztworze HCl w metanolu i uzupełniano do 25 mL w kolbce miarowej. 5 mL tego roztworu uzupełniano 7,5%, wodnym roztworem kwasu fosforowego do 20 mL. Próbkę filtrowano przez filtry strzykawkowe do fiolek HPLC. Na podstawie materiału referencyjnego (suchy ekstrakt z owoców borówki czarnej RWP) zidentyfikowano piki i obliczano zawartość antocyjanów w przeliczeniu na chlorek 3-O-glukozydu cyjanidyny. Objętość nastrzyku wzorca i próbki wynosiła 10  $\mu$ L. Rozdziały prowadzono na kolumnie Kinetex Evo C18 5  $\mu$ m; 250/4,6 mm (Phenomenex, Torrance, Kalifornia, USA) w temperaturze 30°C. Chromatografię prowadzono w gradiencie faz ruchomych A i B. Fazą A była mieszanina kwasu mrówkowego i wody w stosunku objętościowym 8,5:91,5. Z kolei fazą B była mieszanina kwasu mrówkowego, acetonitrylu, metanolu i wody w stosunku objętościowym 8,5:22,5:22,5:41,5. Przepływ fazy ruchomej wynosił 1 mL min<sup>-1</sup>, a detekcja odbywała się przy  $\lambda=535$  nm. Stosowano następujący gradient

- 1) 0-35 min. 7-25%B
- 2) 35-45 min. 25-65%B
- 3) 45-46 min. 65-100%B
- 4) 46-50 min. 100%B
- 5) 50-55 min. Powrót do warunków początkowych (7%B)
- 6) 55-60 min. Kondycjonowanie kolumny (7%B).

### **6.5.2. Metody spektrofotometryczne**

#### **Oznaczanie polifenoli metodą Folina-Ciocalteu**

Polifenole oznaczano metodą Folina-Ciocalteu (FC) zgodnie z pracą Sikory i wsp. z niewielkimi modyfikacjami [159]. Ekstrakty rozpuszczano w mieszaninie metanol/woda 40/60 (v/v) zakwaszonej za pomocą 1% kwasu mrówkowego do uzyskania stężenia ekstraktu ok. 1 mg mL<sup>-1</sup>. Roztwory podstawowe rozcieńczano 20-50-krotnie wodą. Do kolb miarowych na 10 mL dodawano po 4 mL wody, 1 mL roztworu ekstraktu, roztworu wzorca lub wody (próba

ślepa), następnie po 0,5 mL odczynnika FC i inkubowano przez 1 minutę. Kolejno dodawano po 2 mL 20% (w/v) roztworu węgla sodu i uzupełniano wodą do kreski. Po 30-minutowej inkubacji w ciemności mierzono absorbancję przy  $\lambda=760$  nm względem próby ślepej.

Do oznaczania polifenoli wykorzystano pięciopunktową krzywą kalibracyjną katechiny.

### **Oznaczanie antocyjanów metodą różnicową.**

Do oznaczanie antocyjanów metodą UV-Vis zastosowano metodę różnicową na podstawie pracy Giusti i Wrolstad, w przeliczeniu na 3-glukozyd cyjanidyny [83]. Metoda jest szybka i dzięki wykorzystaniu charakterystycznej dla antocyjanów zmiany maksimum absorpcji pomiędzy pH 1,0 i 4,5 cechuje się wysoką specyficnością. Wyniki otrzymane tą metodą wykazują korelację z metodą HPLC [84].

Ekstrakty płynne oznaczano rozcieńczając próbki dwoma buforami: i) roztworem chlorku potasu o stężeniu  $0.025 \text{ mol L}^{-1}$  doprowadzonym do pH 1,0 za pomocą roztworu HCl; ii) 0,4M buforem octanowym pH 4,5. Następnie mierzono absorbancję każdej z próbek przy dwóch długościach fali – 520 i 700 nm. Za absorbancję przy  $\lambda=520$  nm odpowiadają antocyjany. Z kolei pomiar przy  $\lambda=700$  nm umożliwia odjęcie absorbancji niespecyficznej, za którą odpowiedzialne są substancje inne niż antocyjany.

Zawartość antocyjanów wyrażoną w  $\text{mg L}^{-1}$  obliczano na podstawie Równania 3.

$$\frac{A \times MW \times DF \times 1000}{\varepsilon} \quad (3)$$

gdzie:

A – ( $A_{520} - A_{700}$ )

MW – masa molowa, w przypadku 3-glukozydu cyjanidyny =  $449,2 \text{ g mol}^{-1}$

DF – rozcieńczenie próbki

$\varepsilon$  – molowy współczynnik absorbancji,

w przypadku 3-glukozydu cyjanidyny =  $26\,900 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Próbki stałe rozpuszczano w mieszaninie metanol/woda 40/60 (v/v) do stężenia ekstraktu około  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ . W otrzymanym roztworze oznaczano antocyjany metodą różnicową i obliczano procentową zawartość w przeliczeniu na 3-glukozyd cyjanidyny.

### 6.5.3 Oznaczanie suchej masy ekstraktów

Zawartość suchej masy oznaczano za pomocą wagosuszarki MA 50.R firmy Radwag (RADWAG Wagi Elektroniczne, Radom, Polska). Na tacce wagosuszarki rozprowadzano 0,5- 1 g ekstraktu i suszono do stałej masy w temperaturze 120°C.

## 6.6. Badania biologiczne

Do badań biologicznych w warunkach *in vitro* zastosowano ekstrakt z aronii i 2 ekstrakty z bzu czarnego. Ekstrakt z aronii zbadano pod kątem właściwości przeciwzapalnych na linii makrofagów RAW 264.7 [161]. W celu potwierdzenia, że ekstrakt z aronii, we wszystkich analizowanych stężeniach, jest bezpieczny dla analizowanych komórek wykonano test MTT.

Ekstrakty z owoców bzu czarnego zbadano pod kątem wpływu na proliferację komórek różnych linii nowotworowych oraz nienowotworowych jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC). Wpływ na proliferację tych komórek zbadano za pomocą standardowego testu MTT [164].

### 6.6.1. Właściwości przeciwzapalne ekstraktu z aronii *in vitro*

#### Warunki hodowli komórek RAW 264.7

Typową standaryzacją ekstraktów o wysokiej zawartości antocyjanów jest standaryzacja na 25% antocyjanów [160]. Ekstrakt standaryzowany na 25% antocyjanów przygotowano przez dodanie 2,424 g maltodekstryny do 7,576 g ekstraktu. W celu dodania ekstraktu do pożywek hodowlanych, odważono 2,5 g ekstraktu, który następnie rozpuszczono w wodzie. Objętość uzupełniono wodą w kolbce miarowej na 25 mL. Kolbę inkubowano przez 10 min w łaźni ultradźwiękowej w celu rozpuszczenia ekstraktu. Gotowy roztwór filtrowano przez filtr strzykawkowy 0,2 µm w celu sterylizacji. Rozpuszczony i przefiltrowany ekstrakt dodano w odpowiedniej ilości do hodowli komórkowej.

Komórki RAW 264.7 to makrofagi z myszy. Komórki te można wykorzystać do oznaczenia działania przeciwzapalne [161]. Czynniki martwicy nowotworu alfa (TN- $\alpha$ ) i interleukina 1 $\alpha$  (IL1- $\alpha$ ) są jednymi z mediatorów stanu zapalnego [162]. Ostre zapalenie to normalna reakcja obronna organizmu na infekcję, uraz lub podrażnienie. Jednak przewlekły stan zapalny wiąże się z pewną liczbą chorób przewlekłych, w tym nowotworowych, sercowo-naczyniowych, cukrzycy, artretyzmu, a także autoimmunologicznych i choroby neurologiczne [163].

Komórki RAW 264.7, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) hodowano w pożywce DMEM Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), zawierającej 10% inaktywowaną termicznie FBS, 100 U mL<sup>-1</sup> penicyliny i 100 µg mL<sup>-1</sup> streptomycyny. Komórki hodowano w stałej wilgotności w 37°C w atmosferze zawierającej 95% powietrza i 5% CO<sub>2</sub> przez 96 godzin.

### **6.6.2. Test MTT**

Do określenia cytotoksyczności zastosowano test MTT. Test ten umożliwia zbadanie względnej ilości żywych komórek, które są w stanie przekształcić żółte rozpuszczalne kryształy MTT w fioletowe kryształy formazanu. Wyniki badania porównano z komórkami nie poddanymi inkubacji z ekstraktem z aronii. Komórki hodowano na płytkach 96-dołkowych, wysiewano w ilości 2 × 10<sup>4</sup> komórek na studzienkę, inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37 °C, bez dodatku ekstraktu (próba kontrolna) oraz z dodatkiem różnych ilości ekstraktu (w zakresie 0,5–500 µg mL<sup>-1</sup>). Po hodowli pożywkę usuwano z dołków a komórki przemywano buforowaną solą fizjologiczną. Komórki inkubowano z pożywką wolną od surowicy i MTT (0,5 mg/ml, 100 µl/studzienkę) przez 4 godziny. Liczba żywych komórek była proporcjonalna do stężenia wytworzonego nierozpuszczalnego w wodzie formazanu. Absorbancję mierzono spektrofotometrycznie przy λ=563 nm po rozpuszczeniu kryształów formazanu w izopropanolu [164].

W celu określenia wpływu ekstraktu na odpowiedź zapalną komórek RAW 264.7 do hodowli komórek dodano ekstrakt w różnych stężeniach – 0,5, 5 i 500 µg mL<sup>-1</sup>. Komórki stymulowano 1 µg mL<sup>-1</sup> LPS (z E. coli 0111:B4) przez 24 godziny w celu polaryzacji makrofagów w kierunku podtypu prozapalnego i wywołania odpowiedzi zapalnej [165].

Poziomy cytokin (TNF-α i Il-1β) oznaczono ilościowo metodą ELISA zgodnie z instrukcjami producenta (R&D Systems Inc., Abingdon, Wielka Brytania). Poziom dialdehydu malonowego (MDA) oznaczono za pomocą zestawu do oznaczania peroksydacji lipidów (MDA) metodą kompetycyjnego ELISA zgodnie z instrukcjami producenta (Abcam, Cambridge, MA, USA).

### **6.6.3. Warunki hodowli komórek do badania cytotoksyczności ekstraktów z owoców bzu czarnego**

#### **Komórki adherentne**

Linie komórkową ludzkiego gruczołaka płuc (A-549), ludzką linię komórkową raka jajnika (A-2780), ludzką linię komórkową raka sutka (MCF-7) i ludzką linię komórkową raka okrężnicy (Caco-2) zakupiono z European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC,

Porton Down, Wielka Brytania). Linię komórkową ludzkiego raka okrężnicy (HCT-116) otrzymano z American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA).

Komórki A-549 hodowano w pożywce Nutrient Mixture Kaighn's Modification, F12K (Gibco, Waltham, MA, USA) zawierającej 10% płodowej surowicy bydlęcej, FBS (Corning, Nowy Jork, USA) i 1% roztwór antybiotyku przeciwgrzybiczego (A/A; Sigma -Aldrich, Burlington, USA). Komórki A-2780 hodowano w pożywce Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640; Corning, Nowy Jork, USA) uzupełnionej 10% FBS i 1% A/A. Komórki MCF-7 hodowano w pożywce Modified Eagle's Medium (MEM; Corning) zawierającej 10% FBS i odpowiednio 1% A/A lub brak antybiotyków. Komórki Caco-2 hodowano w wysokoglukozowej pożywce Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; ATCC, Manassas, USA) zawierającej 10% FBS, 1% nie-endogennych aminokwasów MEM (NEAA; Biowest, Nuaille, Francja), 1% roztwór penicyliny i streptomycyny (P/S) zakupiono z BioShop (Burlington, Kanada). HCT-116 hodowano na pożywce McCoy's 5A (Biowest, Francja) uzupełnionej 10% FBS i 1% P/S. Wszystkie linie komórkowe inkubowano w 37°C w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>.

### **Komórki nieadherentne**

Jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMC) wyizolowano z kożuszka leukocytarnego (BC) otrzymanego z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Gdańsku. Żywotność komórek zmierzono za pomocą barwienia komórek martwych błękitem trypanu i wynosiła ona około 99%. Ostateczne stężenie limfocytów doprowadzono do 10<sup>6</sup> komórek mL<sup>-1</sup> przez dodanie kompletnej pożywki RPMI 1640 (uzupełnionej 10% FBS i 1% antybiotyku) do zawiesiny pojedynczych komórek.



## **IV WYNIKI I DISKUSJA**

### **7.1. Ekstrakcja antocyjanów**

#### **7.1.1. Ekstrakcja antocyjanów z mrożonych wyłoków aronii czarnoowocowej**

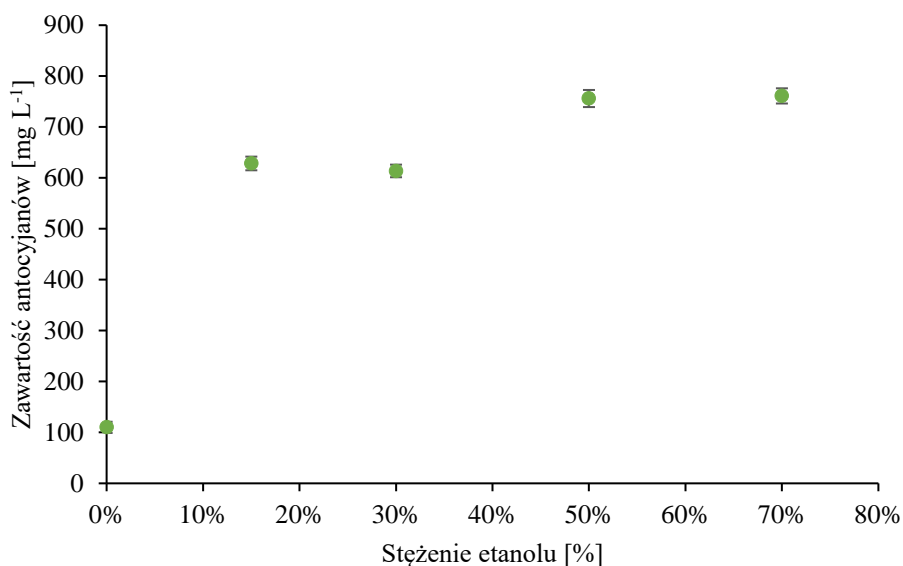
Prace związane z optymalizacją ekstrakcji antocyjanów rozpoczęto od mrożonych wyłoków z *A. melanocarpa*. Aronia czarnoowocowa jest owocem powszechnie przetwarzanym na sok i następnie na koncentrat soku. Podczas wytłaczania soku z owoców powstają wyłoki będące bogatym źródłem antocyjanów. W czasie produkcji soku nawet 60% antocyjanów zostaje w tym materiale odpadowym. Zawartość antocyjanów w wyłokach jest wyższa niż w soku i całych owocach. Wyłoki owocowe mogą być jednak surowcem o mało powtarzalnych właściwościach, ponieważ oprócz samych owoców wpływ na zawartość tych substancji w wyłokach mają warunki tłoczenia jak temperatura czy dodatek enzymów [166–168]. Wyłoki owocowe są materiałem odpadowym i w związku z tym są tanim surowcem do ekstrakcji antocyjanów. Świeże wyłoki są jednak materiałem szybko psującym się i z tego powodu muszą zostać przetworzone, wysuszone lub zamrożone niezwłocznie po wytłoczeniu soku [169].

#### **Ekstrakcja za pomocą alkoholu etylowego**

Ze względu na toksyczność i ograniczenia w stosowaniu rozpuszczalników organicznych w przemyśle spożywczym, sprawdzono wpływ tylko jednego rozpuszczalnika organicznego (alkoholu etylowego) na ekstrakcję antocyjanów.

Na Rysunku 13 przedstawiono wpływ stężenia alkoholu etylowego na zawartość antocyjanów w ekstrakcie. Mimo rozpuszczalności antocyjanów w wodzie, nie jest ona wydajnym ekstrahentem antocyjanów z wyłoków aroniowych. Zawartość antocyjanów w ekstrakcie wodnym wynosiła jedynie około 100 mg L<sup>-1</sup>. Natomiast wykorzystanie roztworów etanolu o stężeniu 15-30% (v/v) powodowała około 6-krotny wzrost wydajności ekstrakcji. Wzrost stężenia alkoholu etylowego do 50-70% (v/v) spowodował znacznie mniejszy wzrost wydajności ekstrakcji. W tym przypadku osiągnięto stężenia przekraczające 700 mg L<sup>-1</sup>. W pracy Ćujić i wsp. [170] ekstrahowano antocyjany i inne polifenole z suszonych owoców aronii wykorzystując roztwory wodne etanolu. Najwyższą wydajność ekstrakcji antocyjanów uzyskano stosując 50% etanol jako ekstrahent. Nieznacznie niższą wydajność uzyskano z użyciem 70% etanolu. Woda, podobnie jak w badaniach w niniejszej pracy, była mało wydajnym ekstrahentem antocyjanów. Stosunek antocyjanów ekstrahowanych za pomocą 50%

etanolu do antocyjanów ekstrahowanych za pomocą wody wynosił około 2:1. W niniejszych badaniach ten stosunek zbliżony jest do 6:1. Różnica ta może być spowodowana zastosowaniem innej formy surowca. Antocyjany oddziałują ze składnikami ścian komórkowych, takimi jak pektyny, hemicelulozy i celuloza za pomocą oddziaływań niekowalencyjnych. Wewnątrz komórek antocyjany znajdują się głównie w wakuolach, ale po uszkodzeniu ścian komórkowych są uwalniane na zewnątrz tych organelli, dzięki czemu w czasie wyłaczania soku mogą oddziaływać ze składnikami ścian komórkowych, które stanowią znaczną część składu wyłoków. Antocyjany związane ze ścianami komórkowymi trudniej ulegają ekstrakcji od zawartych w soku komórkowym w wakuolach [171,172].



Rysunek 13. Wpływ stężenia alkoholu etylowego na ekstrakcję antocyjanów z wyłoków z aronii. Ekstrakcję prowadzono przez 120 min., w temperaturze 40°C.

Do ekstrakcji w większej skali wybrano 15% i 70% roztwór etanolu. Oba ekstrakty, po separacji surowca, zagęszczano na wyparce próżniowej w celu odparowania etanolu, co jest niezbędne przed związaniem antocyjanów z żywicą adsorpcyjną. Ekstrakt podawany na kolumnę wypełnioną żywicą adsorpcyjną nie może zawierać zawieszonych cząstek stałych, które zapychają złożę i uniemożliwiają przeprowadzenie rozdzielania. Po odparowaniu alkoholu z ekstraktu wytrąciła się znaczna ilość osadu, która uniemożliwiała filtrację na prasie filtracyjnej. Dodatkowo, ekstrakt po odparowaniu etanolu, intensywnie się pienił, co uniemożliwiło dalsze zagęszczanie bez długotrwałej sedymentacji osadu. W związku z tym, przeprowadzono sedymentację osadu w ciągu 24 godzin w temperaturze 5-8°C. Sedymentacja

spowodowała spadek zawartości antocyjanów w nadsączu o 39%. Wykonano również próby wysuszenia ekstraktów otrzymanych za pomocą etanolu o stężeniu 15% i 70%. Oba ekstrakty zagęszczano próżniowo do uzyskania lepkości odpowiedniej do suszenia (sucha masa około 40%) utrzymując wytrącający się osad w formie zawiesiny. W przypadku suszenia próżniowego otrzymany ekstrakt był plastyczny i przyklejał się do tacki suszarni. Taka konsystencja ekstraktu uniemożliwia wysuszenie ekstraktu w skali produkcyjnej, z powodu przyklejania się ekstraktu do pasów produkcyjnej suszarni próżniowej. Próby wysuszenia rozpyłowego obu ekstraktów nie powiodły się z powodu zaklejania komory suszarni przez ekstrakt.

Do ekstrakcji antocyjanów używane są także zakwaszone roztwory alkoholi alifatycznych, głównie metanolu i etanolu. Zgodnie z pracami badawczymi, zakwaszenie ekstrahenta powoduje wzrost wydajności ekstrakcji a także poprawia stabilność antocyjanów [173–175]. W prezentowanych badaniach zakwaszenie ekstrahenta powodowało tylko nieznaczne, zwiększenie wydajności ekstrakcji (Tabela 1). W trakcie zagęszczania próżniowego wyciągów otrzymanych w wyniku ekstrakcji zakwaszonymi roztworami etanolu, podobnie jak w przypadku ekstrakcji samym roztworem etanolu, wytrącał się trudny do odfiltrowania osad. Sedymentacja osadu spowodowała 33-37% spadek zawartości antocyjanów w nadsączu.

Tabela 1. Wpływ zakwaszenia na ekstrakcję antocyjanów za pomocą roztworu alkoholu etylowego.

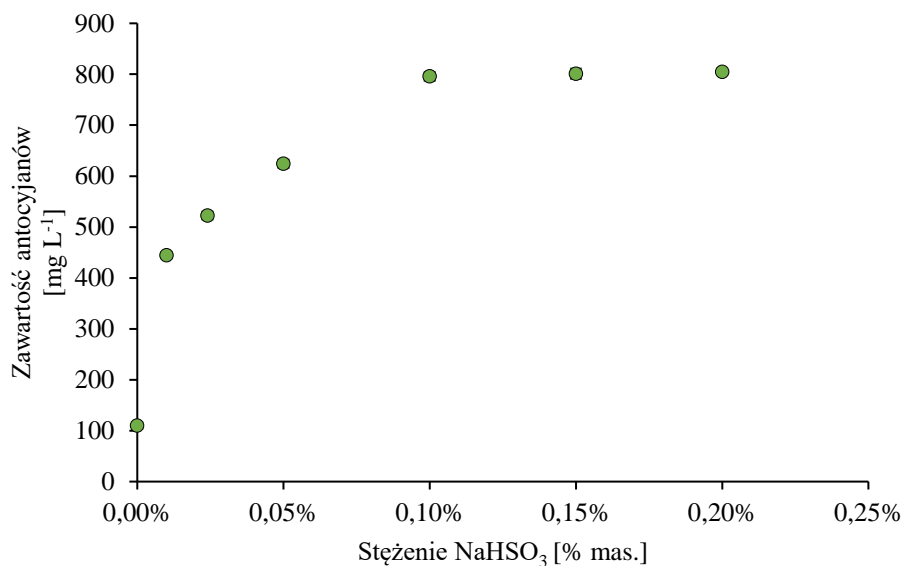
Ekstrahent	Stężenie etanolu [%]	Zawartość antocyjanów [mg L <sup>-1</sup> ]
Etanol	70	761,1±14,9
Etanol + kwas fosforowy; pH 3,0	70	770,3±16,4
Etanol	15	628,4±13,4
Etanol+ kwas fosforowy; pH 3,0	15	637,2±13,7

Z powodu problemów technologicznych, występujących podczas przetwarzania ekstraktów otrzymanych za pomocą mieszanin wodno-etanolowych, sprawdzono także możliwość zastosowania innych ekstrahentów.

#### **Ekstrakcja za pomocą wodorosiarczanu (IV) sodu**

Do ekstrakcji antocyjanów z różnych surowców roślinnych używane są również roztwory dwutlenku siarki oraz dopuszczone do stosowania w przemyśle spożywczym

siarczany (IV) [70,71,176]. Siarczany (IV) mogą jednak powodować alergie i z tego powodu muszą być usunięte z końcowego produktu, tak aby ich zawartość nie przekraczała 10 ppm w przeliczeniu na  $\text{SO}_2$  [72,177]. Z kolei zaletami zastosowania siarczanów (IV) do ekstrakcji są właściwości konserwujące oraz stabilizacja antocyjanów dzięki właściwościom przeciwutleniającym siarczanów (IV) [178,179].



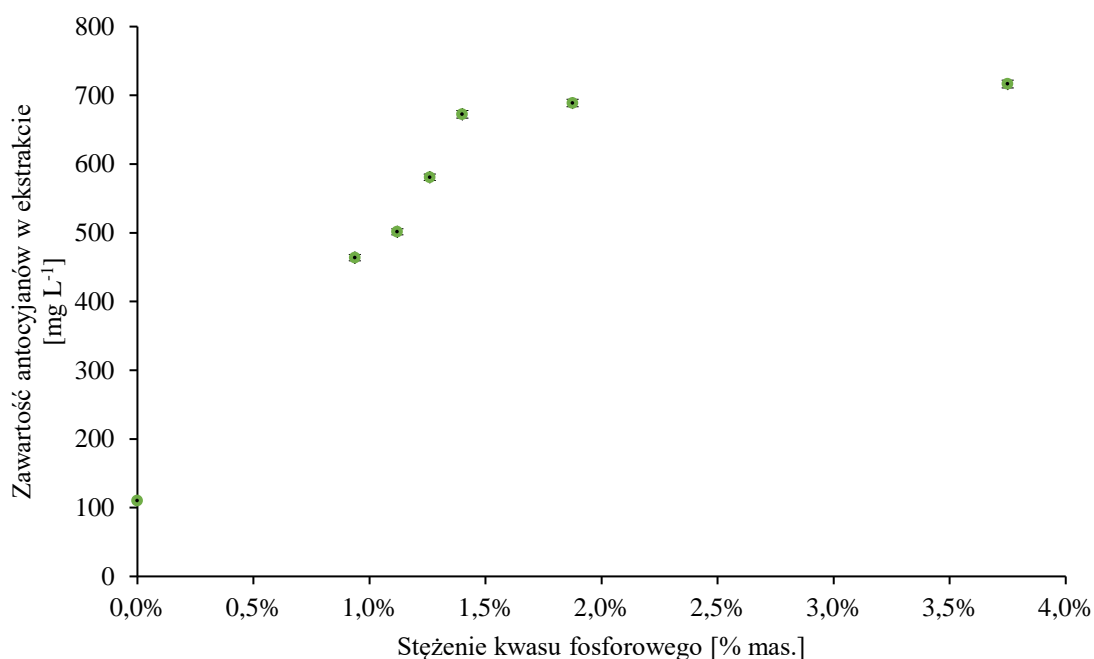
Rysunek 14. Wpływ stężenia wodorosiarczynu sodu na ekstrakcję antocyjanów z wyłoków z aronii. Ekstrakcję prowadzono przez 120 min., w temperaturze  $40^\circ\text{C}$ .

Na Rysunku 14 przedstawiono zależność wydajności ekstrakcji antocyjanów od stężenia  $\text{NaHSO}_3$ . Zastosowanie roztworu wodorosiarczanu (IV) sodu umożliwiło uzyskanie o 5,6% wyższej wydajności niż ekstrakcja za pomocą 70% etanolu (795,6 w porównaniu do 761,1  $\text{mg L}^{-1}$ ). Na podstawie wyników wytypowano stężenie 0,1% wodorosiarczanu (IV) sodu do ekstrakcji antocyjanów z wyłoków z aronii do dalszych badań, z uwagi na fakt, że dalszy wzrost stężenia  $\text{NaHSO}_3$  nie powoduje wzrostu wydajności ekstrakcji. W celu zweryfikowania technologii i oznaczenia pozostałości siarczanów (IV), ekstrakt doprowadzony do pH 3,0 podano na kolumnę wypełnioną żywicą adsorpcyjną Diaion HP-20. Do elucji zastosowano 70% alkohol etylowy. Ekstrakt otrzymany w wyniku elucji, zagęszczania i suszenia rozpyłowego zawierał 30,6% antocyjanów. Próbka suchego ekstraktu została wysłana do zewnętrznego laboratorium PozLab Sp. z o.o. (Poznań, Polska) w celu oznaczenia pozostałości siarczanów (IV) w przeliczeniu na dwutlenek siarki. Zawartość siarczanów (IV) wyniosła 7 000 ppm. Przyczyną tak wysokiego stężenia siarczanów (IV) może być tworzenie z antocyjanami

bezbarnych adduktów, które ulegają adsorpcji na żywicy. Jest to reakcja odwracalna, zależna od pH o stałej dysocjacji wynoszącej ok. 5,0 [178,180]. Mimo zakwaszenia ekstraktu pozostałość siarczanów (IV) jest na bardzo wysokim poziomie. Możliwe rozwiązania to zastosowanie innego ekstrahenta, silniejsze zakwaszenie frakcji głównej eluowanej z kolumny lub przemywanie kolumny przed elucją za pomocą roztworu kwasu.

### Ekstrakcja za pomocą zakwaszonej wody

Doniesienia literaturowe wskazują na możliwość wydajnej ekstrakcji antocyjanów za pomocą wodnych roztworów kwasów organicznych i nieorganicznych dopuszczonych do stosowania w przemyśle spożywczym takich jak cytrynowy, octowy i chlorowodorowy [67,68,170,174]. Kwasy można usunąć z ekstraktu stosując metody separacyjne, np. chromatografię preparatywną. Do przeprowadzenia prób ekstrakcji antocyjanów za pomocą roztworów kwasów wybrano kwas fosforowy. Jest mocniejszy od słabych kwasów używanych w przemyśle spożywczym, bezpieczniejszy dla stali kwasoodpornej od kwasu chlorowodorowego i nie ma właściwości utleniających jak kwas siarkowy.



Rysunek 15. Wpływ stężenia kwasu fosforowego na ekstrakcję antocyjanów z wycieków z aronii. Ekstrakcję prowadzono przez 120 min., w temperaturze 40°C.

Na Rysunku 15 przedstawiono wpływ stężenia kwasu fosforowego na ekstrakcję antocyjanów z wycieków z aronii. Zawartość antocyjanów w otrzymanym ekstrakcie jest niższa

w porównaniu do ekstraktów uzyskanych za pomocą wodorosiarczynu sodu ( $795,6 \text{ mg L}^{-1}$ ) lub 70% etanolu ( $761,1 \text{ mg L}^{-1}$ ), ale znacznie wyższa niż w ekstrakcie otrzymanym za pomocą wody dejonizowanej ( $110 \text{ mg L}^{-1}$ ).

Kolejnym zoptymalizowanym parametrem ekstrakcji był stosunek ekstrahenta do surowca. Zbyt niska wartość tego stosunku powoduje obniżenie wydajności ekstrakcji. Z kolei zbyt wysoka wartość spowoduje zmniejszenie wydajności linii produkcyjnej w skali przemysłowej. W praktyce produkcyjnej można stosować dwustopniową ekstrakcję. Surowiec, po pierwszym stopniu ekstrakcji, ponownie zalewa się ekstrahentem. Dzięki temu można załadować do ekstraktora większą ilość surowca, zmniejsza się także ilość ekstraktu, którą należy podać na kolumnę lub odparować, przy zachowaniu wysokiej wydajności ekstrakcji. Ze względu na specyfikę linii produkcyjnej firmy (moc mieszadeł i parametry dekantera) zastosowano 2 warianty dwustopniowej ekstrakcji. Zalew mniejszy niż 5:1 nie byłby możliwy do wykonania w skali produkcyjnej, ze względu na zbyt wysoką masę surowca w stosunku do mocy mieszadeł w ekstraktorach oraz blokowanie dekantera. W pierwszym wariantcie zastosowano dwa stopnie ekstrakcji w stosunku S/E wynoszącym 10:1. W drugim przypadku zastosowano dwa stopnie ekstrakcji w stosunku S/E wynoszącym 5:1. Z doświadczenia firmy Greenvit wynika, że ekstrakcja na drugim stopniu może trwać krócej niż na pierwszym stopniu. Dlatego ekstrakcję na pierwszym stopniu prowadzono przez 2 godziny, a na drugim - przez jedną godzinę. Do ekstrakcji, w tym przypadku, zastosowano kwas fosforowy o stężeniu 1,4%.

Tabela 2. Wpływ stosunku ekstrahenta do surowca i drugiego stopnia na ekstrakcję antocyjanów z wyłoków aronii.

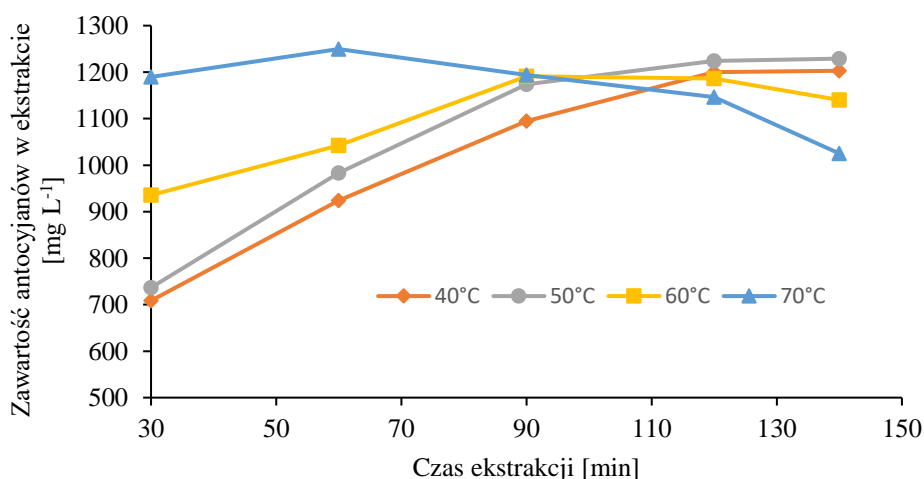
Stosunek ekstrahenta do surowca	Stopień ekstrakcji	Zawartość antocyjanów [ $\text{mg L}^{-1}$ ]	Objętość ekstraktu [L]	Ilość antocyjanów [g]	Wydajność Ekstrakcji [%]
10:1	1	$667,0 \pm 6,4$	8,89	5,92	58,0
10:1	2	$224,5 \pm 3,1$	1,01	2,42	23,7
10:1	Razem 1 i 2 stopień			8,34	81,8
5:1	1	$1211,2 \pm 11,6$	3,91	4,62	45,3
5:1	2	$687,8 \pm 6,9$	4,97	3,41	33,4
5:1	Razem 1 i 2 stopień			8,03	79,9

W Tabeli 2 przedstawiono wpływ stosunku ekstrahenta do surowca (E/S) oraz drugiego stopnia ekstrakcji na wydajność ekstrakcji antocyjanów za pomocą roztworu kwasu

fosforowego. Zmniejszenie E/S z 10:1 na 5:1 spowodowało nieznaczny spadek wydajności ekstrakcji z 81,8% do 79,9%. W związku z tym, do dalszych badań i następnie prac w skali pilotażowej i produkcyjnej zastosowano E/S wynoszący 5:1. Prace naukowe wskazują znacznie wyższy optymalny stosunek E/S, nawet w granicach 20:1 lub 34:1 [181,182]. Prawdopodobnie jest to spowodowane faktem, że prace badawcze często nie biorą pod uwagę możliwości poprawienia wydajności za pomocą drugiego stopnia ekstrakcji. Nie biorą też pod uwagę warunków przemysłowych, w których ważną rolę ze względu na koszty odgrywa energochłonność procesu czy czasochłonność kolejnych etapów obróbki ekstraktu.

### Czas ekstrakcji i temperatura

Kolejnymi czynnikami, które należało zoptymalizować, prowadząc badania z zakresu ekstrakcji, są czas i temperatura procesu. Próby w tym zakresie wykonano w kilku punktach czasowych dla każdej z temperatur. W wyższej temperaturze proces ekstrakcji zachodzi szybciej dzięki wyższej szybkości dyfuzji i konwekcji oraz większej rozpuszczalności antocyjanów. Z drugiej strony, ogrzewanie powoduje postępującą w czasie degradację antocyjanów, co przyczynia się do spadku zawartości tych substancji w ekstrakcie [68,183].



Rysunek 16. Wpływ czasu ekstrakcji i temperatury na wydajność ekstrakcji antocyjanów z wyłóków aronii za pomocą wodnego roztworu kwasu fosforowego.

Na Rysunku 16 przedstawiono wpływ czasu i temperatury na ekstrakcję antocyjanów z wyłóków aronii za pomocą wodnego roztworu kwasu fosforowego. Podwyższenie temperatury do 60°C i 70°C spowodowało przyspieszenie ekstrakcji i osiągnięcie maksymalnej wydajności

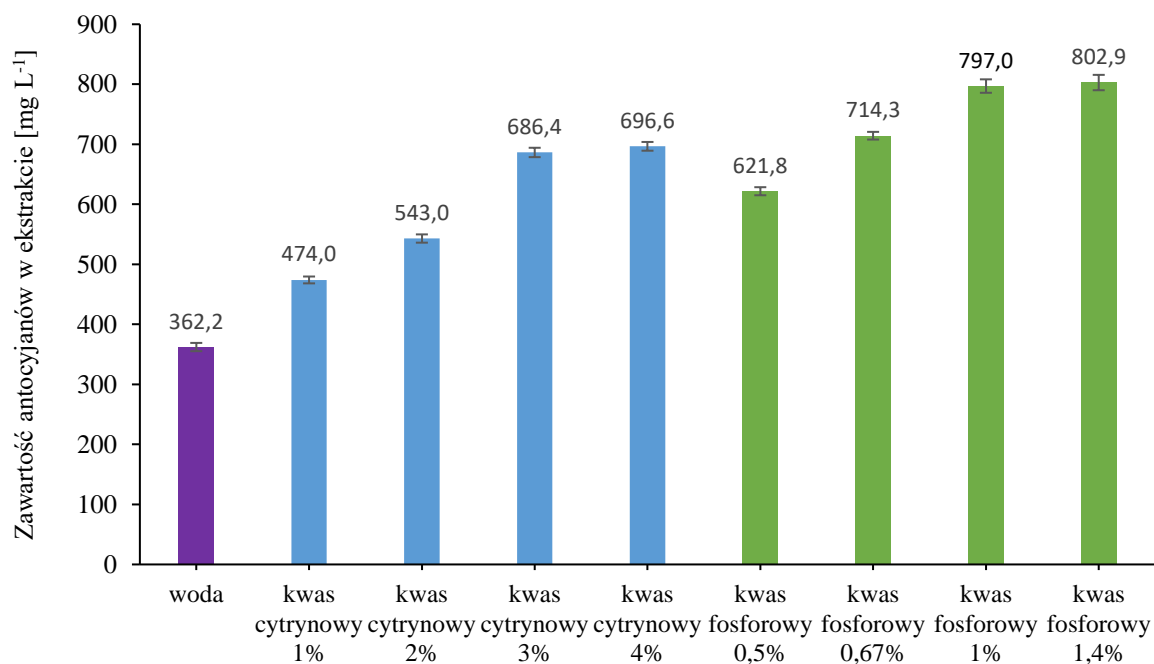
odpowiednio po 60 i 90 minutach. Zauważono także, że podczas dłuższej ekstrakcji następuje spadek zawartości antocyjanów. Z kolei w temperaturze 40 i 50°C maksymalna wydajność osiągnięta jest po dłuższym czasie ekstrakcji – po 120 minutach. W dwóch niższych temperaturach nie stwierdzono spadku zawartości antocyjanów przy przedłużeniu czasu ekstrakcji do 140 minut. Ekstrakcja w temperaturze 70°C zachodzi w najkrótszym czasie, co jest korzystne z punktu widzenia wydajności i kosztów produkcji. W przypadku zastosowania temperatury 60-70°C należałoby po osiągnięciu maksymalnej wydajności ekstrakcji szybko wychłodzić ekstrakt do temperatury ok 40°C. Jednakże szybkie wychłodzenie kilku tysięcy litrów ekstraktu jest energochłonne i podwyższa koszt wytworzenia ekstraktu. Szybkie schłodzenie partii produkcyjnych ekstraktu jest też kłopotliwe przy dostępnej infrastrukturze zakładu produkcyjnego. Z kolei podwyższenie temperatury ekstrakcji do 50°C nie powoduje znacznego przyspieszenia procesu i przyczynia się do niewielkiego wzrostu kosztów. Z wyżej wymienionych powodów kolejne próby w skali laboratoryjnej i testy w większej skali zostały przeprowadzone w temperaturze 40°C w czasie 120 minut.

Badania dotyczące ekstrakcji antocyjanów z pozostałych surowców roślinnych ograniczono do wodnych roztworów kwasów, z przedstawionych powodów. Ekstrakcja wycieków aronii za pomocą roztworów etanolu i wodorosiarczynu sodu powodowała problemy technologiczne. Dodatkowo, w przypadku zastosowania do ekstrakcji rozpuszczalnika organicznego należy ten rozpuszczalnik odparować przed podaniem na kolumnę chromatograficzną. Odparowanie rozpuszczalnika podwyższa koszty i wymusza konieczność instalacji dodatkowej wyparki produkcyjnej.

### **7.1.2. Ekstrakcja antocyjanów z mrożonych owoców aronii czarnoowocowej**

Wytłoki owocowe są tanim i wydajnym źródłem antocyjanów i innych polifenoli. Są jednak odpadem szybko psującym się i nie są dostępne przez cały rok w ilościach niezbędnych do potrzeb produkcyjnych. Dodatkowo, zawartość antocyjanów w wyciekach może się znacznie różnić nie tylko zależnie od warunków uprawy czy odmiany. Wpływ na zawartość antocyjanów w wyciekach mają również warunki tłoczenia soku takie jak temperatura, czas maceracji i blanszowania oraz stosowane enzymy [166,167]. Z tych powodów, przeprowadzono również próby ekstrakcji całych rozdrobnionych mrożonych owoców, które są alternatywą dla wycieków.





Rysunek 17. Wpływ rodzaju i stężenia kwasu na ekstrakcję antocyjanów z mrożonych owocach aronii. Ekstrakcję prowadzono przez 120 min, w temperaturze 40°C.

Do prób ekstrakcji zastosowano kwas fosforowy i cytrynowy o różnych stężeniach (Rysunek 17). Najkorzystniejsze wyniki uzyskano stosując do ekstrakcji 1% roztwór kwasu fosforowego. W przypadku kwasu cytrynowego o stężeniu 3% otrzymano o 13,9% niższą zawartość antocyjanów w ekstrakcie. W badaniach Roda-Serrat i wsp. [181] do ekstrakcji antocyjanów z wyłoków z aronii zastosowano kwas cytrynowy. Najwyższą wydajność ekstrakcji uzyskano za pomocą 1,5% roztworu tego kwasu w temperaturze 45°C. Jednakże autorzy nie badali ekstrakcji za pomocą wyższych stężeń kwasu i zastosowali znacznie wyższy stosunek ekstrahenta do surowca (34:1). Tak wysoka wartość E/S jest niepraktyczna w warunkach przemysłowych, ze względu na ograniczenie wydajności produkcji.

Tabela 3. Wpływ drugiego stopnia na ekstrakcję antocyjanów z owoców aronii.

Stopień ekstrakcji	Ekstrahent	Zawartość antocyjanów [mg L <sup>-1</sup> ]	Ilość antocyjanów wyekstrahowanych z 100 g surowca [mg]
1	1% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	802,4±11,2	16 ±5
2 <sup>#</sup>	1% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	148,5±2,1	30 ±1
2	Woda	135,1±2,1	27 ±1
1	3% kwas cytrynowy	698,4±7,8	144 ±5
2 <sup>*</sup>	3% kwas cytrynowy	180,0±2,8	37 ±1
2 <sup>*</sup>	Woda	168,7±2,6	36 ±1
1+2 <sup>##</sup>	Kwas fosforowy		191±5
1+2 <sup>**</sup>	Kwas cytrynowy		180±5

\*Na pierwszym stopniu ekstrakcji zastosowano kwas cytrynowy.

\*\*Na pierwszym i drugim stopniu ekstrakcji zastosowano kwas cytrynowy.

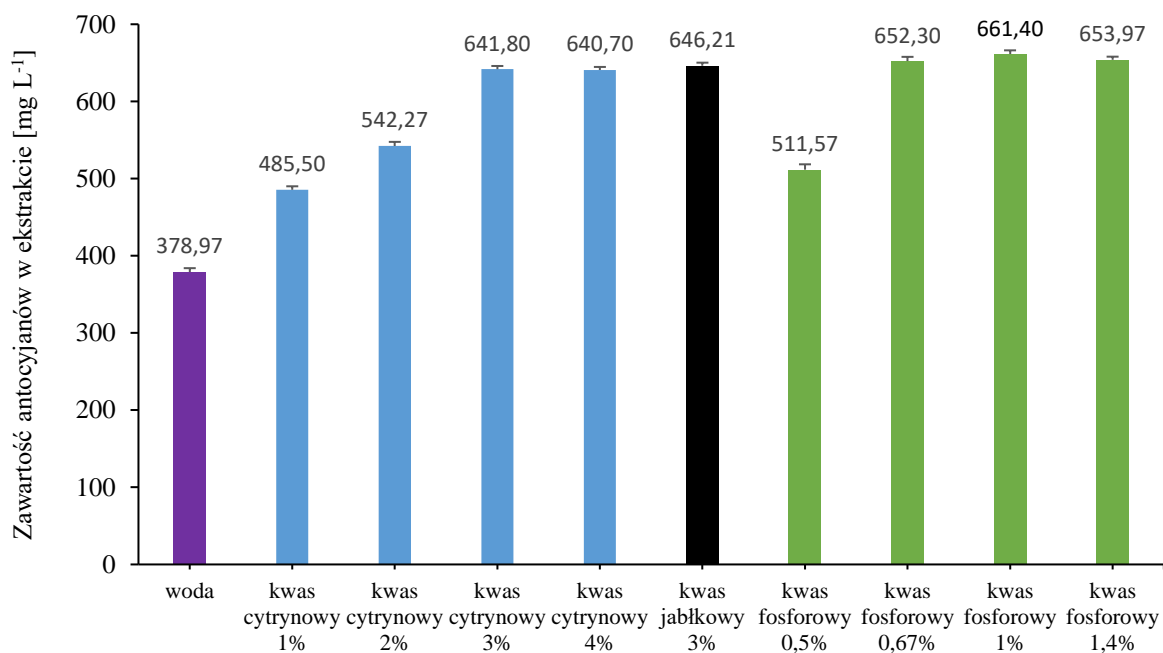
#Na pierwszym stopniu ekstrakcji zastosowano kwas fosforowy.

##Na pierwszym i drugim stopniu ekstrakcji zastosowano kwas fosforowy.

Wpływ drugiego stopnia ekstrakcji na odzysk antocyjanów zaprezentowano w Tabeli 3. Biorąc pod uwagę pierwszy i drugi stopień ekstrakcji, wydajność ekstrakcji za pomocą kwasu cytrynowego jest niższa od wydajności ekstrakcji za pomocą kwasu fosforowego o 5,7%. Różnica ta nie jest znacząca, z punktu widzenia skali przemysłowej. Z tego powodu, do ekstrakcji można używać obu kwasów, zależnie od ich aktualnych kosztów.

### 7.1.3. Ekstrakcja antocyjanów z mrożonych owoców bzu czarnego

Próby ekstrakcji owoców bzu czarnego wykonano stosując stosunek ekstrahenta do surowca wynoszący 5:1, w temperaturze 40°C. Na Rysunku 18 przedstawiono wpływ stężenia i rodzaju kwasu na ekstrakcję antocyjanów z mrożonych owoców bzu czarnego.

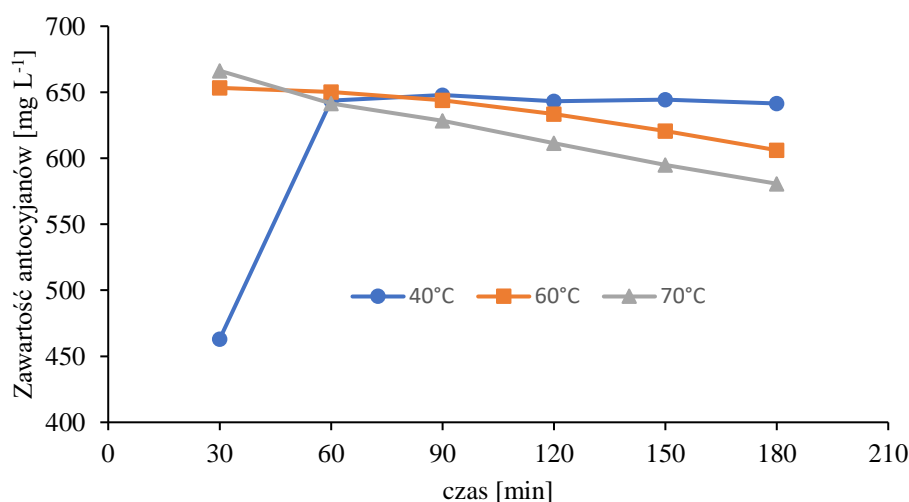


Rysunek 18. Wpływ rodzaju i stężenia kwasu na ekstrakcję antocyjanów z mrożonych owoców bzu czarnego. Ekstrakcję prowadzono przez 120 min., w temperaturze 40°C.

Do ekstrakcji antocyjanów z mrożonych owoców bzu czarnego wystarczy mniejsze zakwaszenie niż do ekstrakcji antocyjanów z owoców aronii. Maksymalną zawartość antocyjanów uzyskano przy stężeniu  $H_3PO_4$  wynoszącym 0,67% kwasu. Wydajność ekstrakcji za pomocą kwasu fosforowego jest wyższa od wydajności uzyskanej za pomocą kwasu cytrynowego tylko o niecałe 3%. Dodatkowo zbadano również ekstrakcję antocyjanów za pomocą kwasu jabłkowego o stężeniu 3%, który umożliwia uzyskanie wydajności ekstrakcji wyższej o 0,86% od wydajności ekstrakcji uzyskanej za pomocą kwasu cytrynowego o takim samym stężeniu. Nie kontynuowano jednak dalszych prób ekstrakcji z zastosowaniem kwasu jabłkowego, ponieważ jest on około 3-krotnie droższy od kwasu cytrynowego. Z kolei kwas fosforowy powoduje silniejsze rozdrobnienie surowca i ekstrakt otrzymany za pomocą tego kwasu będzie powodował problemy związane z filtracją. Z tych powodów do dalszych badań zastosowano kwas cytrynowy. Istnieje również możliwość wydajnej ekstrakcji za pomocą kwasu fosforowego, zależnie od aktualnych kosztów.

## Wpływ czasu i temperatury ekstrakcji

Na Rysunku 19 przedstawiono wpływ czasu i temperatury na ekstrakcję antocyjanów z mrożonych owoców bzu czarnego za pomocą 3% wodnego roztworu kwasu cytrynowego. W temperaturze wynoszącej 40°C maksymalną wydajność osiągnięto już po sześćdziesięciu minutach ekstrakcji. Przedłużenie czasu ekstrakcji do 180 minut nie spowodowało wzrostu wydajności ani wyraźnego spadku zawartości antocyjanów. W temperaturze 60 i 70°C, podobnie jak w przypadku ekstraktu z aronii, wydłużanie czasu ekstrakcji powodowało stopniowy spadek zawartości antocyjanów w ekstrakcie. Z tych powodów do dalszych prac zastosowano temperaturę 40°C i czas ekstrakcji wynoszący 1 godzinę.



Rysunek 19. Wpływ czasu i temperatury na ekstrakcję antocyjanów z mrożonych owoców bzu czarnego. Ekstrahent – 3% wodny roztwór kwasu cytrynowego.

### 7.1.4. Ekstrakcja antocyjanów z suszonych wytlóków bzu czarnego

Mrożone wytlóki z owoców bzu czarnego charakteryzowały się niską zawartością antocyjanów – 0,08-0,13%. Może to być spowodowane faktem, że wytlóki z owoców bzu czarnego składają się w znacznej większości z pozbawionych antocyjanów nasion. Z powodu niewielkiej zawartości antocyjanów świeże lub mrożone wytlóki z owoców bzu czarnego nie są dobrym surowcem do wytwarzania ekstraktu. Wydajnym źródłem antocyjanów z owoców bzu czarnego mogą być bezpestkowe wytlóki z owoców bzu czarnego, które składają się niemal wyłącznie ze skórek. Takie wytlóki dostępne są także w formie suszonej. Ponieważ wytlóki owocowe zawierają ok. 50% wody [184] próby ekstrakcji suszonych, bezpestkowych

wytłoków z owoców bzu czarnego przeprowadzono przy E/S wynoszącym 10:1. Pozostałe warunki dobrano na podstawie wyników wcześniejszych badań – czas ekstrakcji 120 min. i temperatura 40°C.

Tabela 4. Wyniki ekstrakcji antocyjanów z suszonych wytłoków z owoców bzu czarnego.

Stopień ekstrakcji	Stężenie kwasu cytrynowego [%]	Zawartość antocyjanów [mg L <sup>-1</sup> ]	Ilość antocyjanów wyekstrahowanych z 100 g surowca [mg]
1	1,5	798,0±11,4	399±6
1	2,0	815,3±9,3	408±5
1	2,5	887,7±9,1	444±5
1	3,0	1349,3±15,9	675±8
1	4,0	1284,1±15,6	642±8
2*	3,0	462,1±5,0	231±3
2*	0,0	458,2±5,0	227±3
1+2**	3,0		906±11

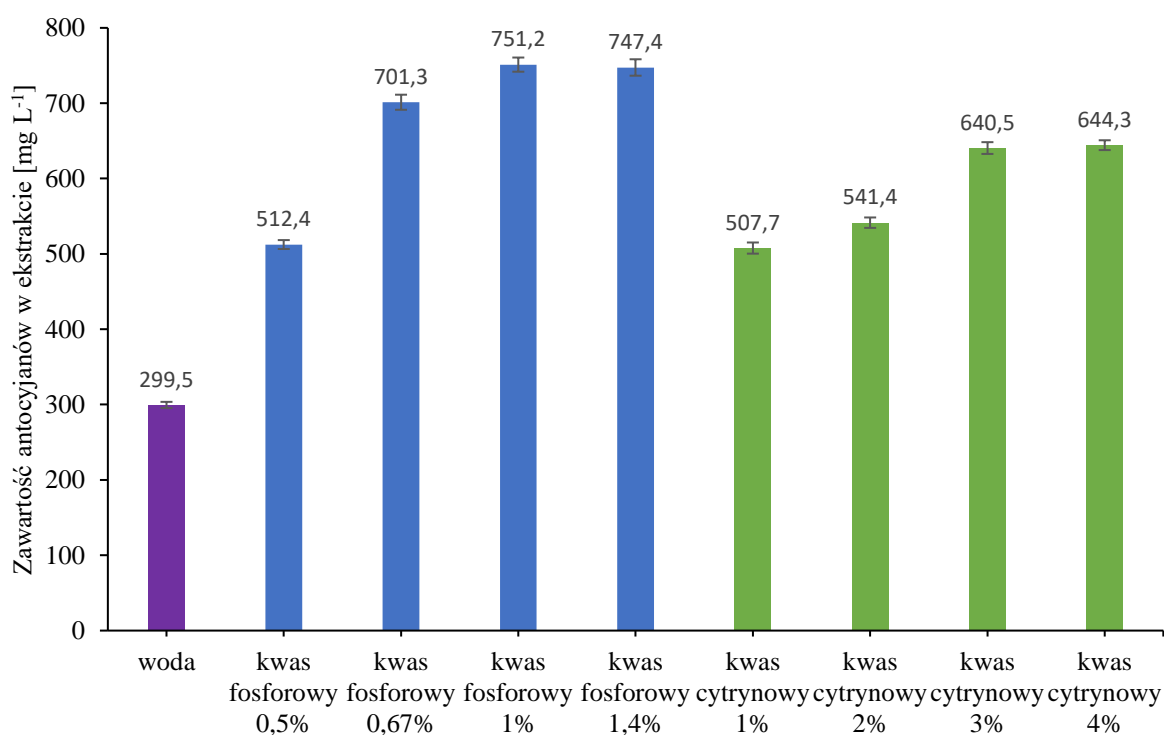
\*Na pierwszym stopniu ekstrakcji zastosowano kwas cytrynowy, na drugim stopniu wodę.

\*\*Na pierwszym i drugim stopniu ekstrakcji zastosowano kwas cytrynowy.

W Tabeli 4 przedstawiono wyniki ekstrakcji antocyjanów z suszonych wytłoków z owoców bzu czarnego. Do prac w większej skali wybrano stężenie kwasu cytrynowego w pierwszym zalewie wynoszące 3%. Zwiększenie stężenia kwasu do 4% spowodowało spadek wydajności ekstrakcji o 4,8%. Natomiast zastosowanie niższego stężenia kwasu powodowało wyraźny spadek wydajności ekstrakcji. Co ciekawe, na drugim stopniu ekstrakcji, zastosowanie wody zamiast roztworu kwasu zapewniło niemal identyczną wydajność ekstrakcji. W pracy Kaack [185] ekstrahowano wytłoki z owoców bzu czarnego za pomocą wodnych roztworów kwasu cytrynowego. Najwyższą wydajność osiągnięto z zastosowaniem 8-10% roztworu tego kwasu. W badaniach przedstawionych w niniejszej pracy, podwyższenie stężenia kwasu cytrynowego nie spowodowało podwyższenia wydajności ekstrakcji. Przyczyną różnicy mógł być zbyt krótki, dziesięciominutowy czas ekstrakcji zastosowany przez autora cytowanej publikacji. Zastąpienie roztworu kwasu wodą na drugim stopniu ekstrakcji nie spowodowało, podobnie jak w niniejszej pracy, istotnej zmiany wydajności ekstrakcji.

### 7.1.5. Ekstrakcja antocyjanów z mrożonych owoców borówki czarnej

Rysunek 20 przedstawia wpływ rodzaju i stężenia kwasu na ekstrakcję antocyjanów z mrożonych owoców. Podobnie jak w przypadku owoców bzu czarnego, spośród przetestowanych stężeń kwasu cytrynowego najbardziej wydajną ekstrakcję uzyskano za pomocą 3% roztworu. Z kolei do wydajnej ekstrakcji antocyjanów niezbędne było wyższe stężenie kwasu fosforowego (1%) niż w przypadku owoców *S. nigra*. W przypadku owoców *Vaccinium myrtillus* różnica pomiędzy zawartością antocyjanów w ekstrakcie uzyskanym za pomocą kwasu fosforowego i cytrynowego była większa niż w przypadku ekstrakcji owoców bzu czarnego. Kwas fosforowy ekstrahował o 14,7% więcej antocyjanów niż roztwór kwasu cytrynowego. Podobnie jak w przypadku owoców bzu czarnego kwas fosforowy przyczynia się do mocniejszego rozdrobnienia surowca i trudniejszej filtracji. Do sprawdzenia wydajności drugiego stopnia ekstrakcji zastosowano zarówno kwas fosforowy jak i cytrynowy.



Rysunek 20. Wpływ rodzaju i stężenia kwasu na ekstrakcję antocyjanów z mrożonych owoców borówki czarnej. Czas ekstrakcji wynosił 120 minut, temperatura 40°C.

Wyniki przedstawione w Tabeli 5 wskazują, że dwustopniowa ekstrakcja za pomocą 3% kwasu cytrynowego jest o 5% mniej wydajna od ekstrakcji przy użyciu 1% kwasu

fosforowego. Do prób separacji antocyjanów oraz do próby w skali produkcyjnej zastosowano ekstrakcję za pomocą kwasu cytrynowego. Mimo wydajności wyższej o 5%, ekstrakcja za pomocą kwasu fosforowego przyczynia się do utrudnionej filtracji ekstraktu.

Tabela 5. Wyniki dwustopniowej ekstrakcji antocyjanów z owoców borówki czarnej.

Stopień ekstrakcji	Ekstrahent	Zawartość antocyjanów w ekstrakcie [mg L <sup>-1</sup> ]	Ilość antocyjanów wyekstrahowanych z 100 g surowca [mg]
1	3% kwas cytrynowy	643,8±7,8	346±4
2*	3% kwas cytrynowy	100,2±1,2	51±1
2*	Woda	96,8±1,1	48±1
1	1% kwas fosforowy	750,4±9,4	390±5
2 <sup>#</sup>	1% kwas fosforowy	56,0±1	28±1
2 <sup>#</sup>	Woda	55,5±1	28±1
1+2 <sup>**</sup>	3% kwas cytrynowy		397±5
1+2 <sup>##</sup>	1% kwas fosforowy		418±5

\*Na pierwszym stopniu ekstrakcji zastosowano 3% kwas cytrynowy, na drugim stopniu wodę.

\*\*Na pierwszym i drugim stopniu ekstrakcji zastosowano 3% kwas cytrynowy.

<sup>#</sup>Na pierwszym stopniu ekstrakcji zastosowano 1% kwas fosforowy.

<sup>##</sup>Na pierwszym i drugim stopniu ekstrakcji zastosowano 1% kwas fosforowy.

## 7.2. Chromatografia preparatywna

### 7.2.1. Separacja antocyjanów z owoców aronii na żywicach adsorpcyjnych

Do testów adsorpcji i desorpcji antocyjanów na żywicach adsorpcyjnych wytypowano żywice o różnej strukturze chemicznej (styren-DVB oraz metakrylowa), różniące się wielkością porów (90-550 Å) a także powierzchnią właściwą. Zestawienie wyników oraz najważniejszych parametrów żywic przedstawiono w Tabeli 6. Jediną przetestowaną żywicą o strukturze metakrylowej jest Amberlite XAD-7HP. Jest to złożo polarne, o wysokim momencie dipolowym, którego główny mechanizm adsorpcji opiera się na wiązaniach wodorowych z adsorbowanymi cząsteczkami [186,187]. Amberlite XAD-7 i Amberlite XAD-7HP są powszechnie stosowane do separacji antocyjanów z różnych surowców, takich jak np. czerwony kabaczek [188], fioletowy ziemniak [189], aronia [190], czy bez czarny [40]. W niniejszych badaniach żywica ta miała najniższą pojemność wśród wszystkich przebadanych żywic (0,94 kg antocyjanów/100 l żywicy) i wysoką stratę antocyjanów (33 %) w trakcie całego procesu.

Najkorzystniejsze wyniki uzyskano dla żywicy Relite SP 411 (2,02 kg antocyjanów 100 L<sup>-1</sup> żywicy i 7% strat antocyjanów), a następnie dla Sepabeads SP 700, odpowiednio 1,82 kg antocyjanów 100 L<sup>-1</sup> żywicy i 13% strat. Oba złoża są zbudowane z kopolimeru styren-DVB, a więc mają charakter niepolarny. Mimo znacznie większej powierzchni właściwej żywicy Sepabeads SP 700 wynoszącej co najmniej 1100 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> z jednostki objętości odzyskano o 10% mniej antocyjanów niż w przypadku żywicy Relite SP411. Jednakże, powodu wycofania przez producenta ze sprzedaży żywicy Relite SP411, dalsze prace prowadzono korzystając z żywicy Sepabeads SP700.

Tabela 6. Separacja chromatograficzna ekstraktu z mrożonych wyłoków aronii na różnych żywicach adsorpcyjnych.

Nazwa handlowa	Struktura chemiczna	Powierzchnia właściwa [m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> ]	Przeciętny promień porów [Å]	Przeciętna średnica ziaren żywicy [mm]	Pojemność [kg antocyjanów hL <sup>-1</sup> żywicy]	Strata antocyjanów [%]
<b>Sepabeads SP700</b>	Styren-DVB	Min. 1100	90	0,25	1,82	13,4
<b>Diaion HP20</b>	Styren-DVB	Min. 690	290	0,25	0,95	38,8
<b>Relite SP411</b>	Styren-DVB	Min. 630	100-150	0,25	2,02	7,3
<b>Amberlite XAD-16</b>	Styren-DVB	Min. 800	150	0,35	1,31	28,0
<b>Amberlite XAD-7</b>	Metakrylowa	Min. 450	550	0,43-0,69	0,94	33,9

### 7.2.2. Separacja antocyjanów z owoców bzu czarnego na żywicach adsorpcyjnych

W trakcie badań nad ekstraktem z owoców bzu czarnego przeprowadzono analogiczne badania na dwóch kolejnych żywicach: PAD950 oraz PAD550 (Tabela 7). Metakrylowa żywica PAD950 wykazywała znacznie niższą pojemność od innych żywic (0,51 kg antocyjanów hL<sup>-1</sup> złoża). Z kolej wartość tego parametru dla żywicy Sepabeads SP700 wynosiła 1,93. Żywica kopolimerowa (styren-DVB) PAD 550, mimo wysokiej powierzchni właściwej (900 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>) charakteryzowała się znacznie mniejszą zdolnością do adsorpcji antocyjanów od żywicy Sepabeads SP700. Mniejsza pojemność żywicy i wyższa strata antocyjanów mogą być spowodowane zbyt dużym przeciętnym promieniem porów (120 Å w przypadku PAD 550 oraz



90 Å w przypadku Sepabeads SP700). Wskazują na to również wyniki uzyskane dla ekstraktu z aronii, gdzie na Amberlite XAD-16 (800 m<sup>2</sup>×g i 150 Å) uzyskano znacznie mniej korzystne wyniki niż dla Sepabeads SP700 (Tabela 6 i Tabela 7).

Tabela 7. Separacja chromatograficzna ekstraktu z owoców bzu czarnego na różnych żywicach adsorpcyjnych.

Nazwa handlowa	Struktura chemiczna	Powierzchnia właściwa [m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> ]	Przeciętny promień porów [Å]	Przeciętna średnica ziaren żywicy [mm]	Pojemność [kg antocyjanów hL <sup>-1</sup> złoża]	Strata antocyjanów [%]
Sepabeads SP700	Styren-DVB	Min. 1100	90	0,25	1,93	12,5
PAD950	Metakrylowa	Min. 450	120	0,35 – 1,2	0,51	18,9
PAD550	Styren-DVB	Min. 900	120	0,35-1,2	1,16	18,0

### 7.2.3. Separacja antocyjanów z różnych owoców jagodowych na żywicy Sepabeads SP700

Na podstawie badań przeprowadzonych na różnych żywicach i ekstraktach z aronii i bzu czarnego, do dalszych badań wytypowano żywicę Sepabeads SP700. Spośród dostępnych w sprzedaży żywic cechowała się najniższą stratą antocyjanów w procesie oraz najwyższą pojemnością. W tym etapie badań przeprowadzono próby na wybranej żywicy z udziałem różnych surowców. Do prób wytypowano ekstrakty, wyprodukowane z surowców o różnej zawartości antocyjanów. Na kolumnę za każdym razem podawano taką samą ilość antocyjanów, niezależnie od ich zawartości w płynnym ekstrakcie. Wymagało to podania na tę samą kolumnę różnych objętości ekstraktu.

#### Ekstrakt z aronii

Wyniki separacji antocyjanów z ekstraktu z aronii przedstawiono w Tabeli 8. Spośród czterech prób separacji ekstraktów, 3 z nich zawierają powyżej 25% antocyjanów w suchej masie ekstraktu. 25% to typowa standaryzacja ekstraktów o wysokiej zawartości antocyjanów [160]. Niespełniający tej standaryzacji ekstrakt z próby nr 2 został wyprodukowany z wycieków o zawartości antocyjanów 0,61%. Zawartość antocyjanów w suchej masie tego ekstraktu

wynosiła jedynie 18%. W pozostałych próbach zawartość antocyjanów w suchej masie wahała się od 34,2 do 44,4%. Są to wartości znacznie przekraczające oczekiwane 25%. W celu otrzymania ekstraktu zawierającego 25% antocyjanów można wysuszyć ekstrakt z odpowiednim dodatkiem nośnika, np. maltodekstryny lub gumy arabskiej. Suszenie ekstraktu z dodatkiem nośnika może dodatkowo poprawić stabilność polifenoli, w szczególności antocyjanów [94,191]. W ekstraktach po separacji chromatograficznej, wyższe zawartości antocyjanów w ekstrakcie otrzymano z surowców o wyższej zawartości antocyjanów (Tabela 8).

Tabela 8. Wyniki separacji ekstraktów z aronii na kolumnie wypełnionej złożem Sepabeads SP700.

Surowiec	Mrożone wycłoki z aronii, 0,61% antocyjanów	Mrożone wycłoki z aronii, 1,03% antocyjanów	Mrożone owoce aronii, 0,67% antocyjanów, tylko 1 stopień ekstrakcji	Mrożone owoce aronii, 0,56% antocyjanów
Objętość ekstraktu podanego na kolumnę [L]	13,7	7,6	7,9	14,6
Zawartość antocyjanów [mg L <sup>-1</sup> ]	676±7	1216±16	1171±18	632±10
<b>Fracja główna</b>				
Objętość [L]	1,3	1,3	1,3	1,3
Sucha masa [%]	3,19±0,11	1,94±0,09	1,48±0,08	1,76±0,10
Zawartość antocyjanów [mg L <sup>-1</sup> ]	5384±53	6246±62	6218±58	6253±60
Zawartość antocyjanów w przeliczeniu na suchą masę [%]	18,0±0,6	34,2±1,5	44,4±2	37,9±2,1
Odzysk antocyjanów na kolumnie [%]	76,3±1,0	88,1±1,0	87,4±0,9	88,1±1

### Ekstrakt z bzu czarnego

Próby oczyszczania ekstraktów z owoców lub wycłoków bzu czarnego wskazują na możliwość otrzymania ekstraktów o standaryzacjach w granicach 29,6-39,2% antocyjanów (Tabela 9). Najniższą zawartość antocyjanów otrzymano dla ekstraktu z suszonych wycłoków o zawartości antocyjanów 1,4%. W próbkach owoców bzu czarnego oznaczono suche masy mieszczące się w przedziale 21-23%. Zawartości antocyjanów w przeliczeniu na suchą masę owoców zastosowanych do wytworzenia badanych ekstraktów mieszczą się w granicach 2,18-

2,68%, są więc znacznie wyższe od zawartości w suszonych wyciekach zastosowanych do produkcji próby nr 4. Niska, w porównaniu z owocem, zawartość antocyjanów w suszonych wyciekach może być spowodowana degradacją części antocyjanów w trakcie suszenia lub w trakcie wyciekania soku.

Tabela 9. Wyniki separacji ekstraktów z owoców bzu czarnego na kolumnie wypełnionej złożem Sepabeads SP700.

<b>Surowiec</b>	Mrożone owoce bzu czarnego, 0,48% antocyjanów	Mrożone owoce bzu czarnego, 0,56% antocyjanów	Mrożone owoce bzu czarnego, 0,59% antocyjanów	Suszone wycieki z owoców bzu czarnego, 1,4% antocyjanów
<b>Objętość [L]</b>	13,73	10,07	8,27	7,90
<b>Zawartość antocyjanów [mg L<sup>-1</sup>]</b>	817±17	914±16	1114±21	1168±23
<b>Fracja główna</b>				
<b>Objętość [L]</b>	0,75	1,40	1,30	1,30
<b>Sucha masa [%]</b>	3,39±0,12	1,65±0,09	1,74±0,08	2,0±0,09
<b>Zawartość antocyjanów [mg L<sup>-1</sup>]</b>	10090±93	5850±41	6378±47	5502±38
<b>Zawartość antocyjanów W przeliczeniu na suchą masę [%]</b>	32±0,8	38,2±2,1	39,2±2,0	29,6±1,3
<b>Odzysk antocyjanów na kolumnie [%]</b>	82	89	90	80

Powszechnie stosowanym standardem rynkowym dla suplementów diety są ekstrakty o zawartości antocyjanów powyżej 25% [160]. Z kolei monografia suchego ekstraktu z owoców bzu czarnego z Farmakopei Amerykańskiej przewiduje standaryzację na poziomie minimum 17% antocyjanów [30]. Zgodnie z wynikami przedstawionymi w Tabeli 9, wszystkie partie laboratoryjne zawierają powyżej 29% antocyjanów, a więc spełniają oba standardy.

W przypadku ekstraktu z suszonych wycieków we frakcji głównej po separacji chromatograficznej odzyskano 80% antocyjanów podanych na kolumnę. W ekstraktach z owoców odzyskano powyżej 82% antocyjanów w próbie nr 1. W przypadku tej partii zebrano frakcję główną w objętości równej 1,5 objętości żywicy (BV). W laboratoryjnych próbach 2 i 3 odzyskano 89-90%. W B2 i B3 zabrano frakcje główne o objętości 2,6-2,8 BV.

## Ekstrakt z borówki czarnej

Separacja antocyjanów z owoców borówki czarnej na złożu Sepabeads SP700 umożliwiła otrzymanie ekstraktów o wyższej standaryzacji niż ekstrakty z owoców aronii i bzu czarnego. Zawartości antocyjanów we frakcjach głównych wahają się od 43,7% dla ekstraktu z owoców o zawartości antocyjanów wynoszącej 0,44% do nawet 51,2% dla ekstraktu z owoców o zawartości 0,56% antocyjanów (Tabela 10).

Tabela 10. Wyniki separacji ekstraktów z borówki czarnej na kolumnie wypełnionej złożem Sepabeads SP700.

Surowiec	Owoce borówki czarnej, 0,56% antocyjanów	Owoce borówki czarnej, 0,51% antocyjanów	Owoce borówki czarnej, 0,44% antocyjanów
<b>Objętość [L]</b>	11,2	12,5	15,2
<b>Zawartość antocyjanów [mg L<sup>-1</sup>]</b>	826,3±15,2	737,3±16,1	607,2±13,5
<b>Frakcja główna</b>			
<b>Objętość [L]</b>	1,3	1,0	1,0
<b>Sucha masa [%]</b>	1,43±0,08	1,91±0,09	2,00±0,08
<b>Zawartość antocyjanów [mg L<sup>-1</sup>]</b>	6879±55	8954±60	8741±49
<b>Zawartość antocyjanów w przeliczeniu na suchą masę [%]</b>	51,2±2,7	49,9±2,3	43,7±1,7
<b>Odzysk antocyjanów na kolumnie [%]</b>	97,0±0,4	97,1±0,7	94,7±0,6

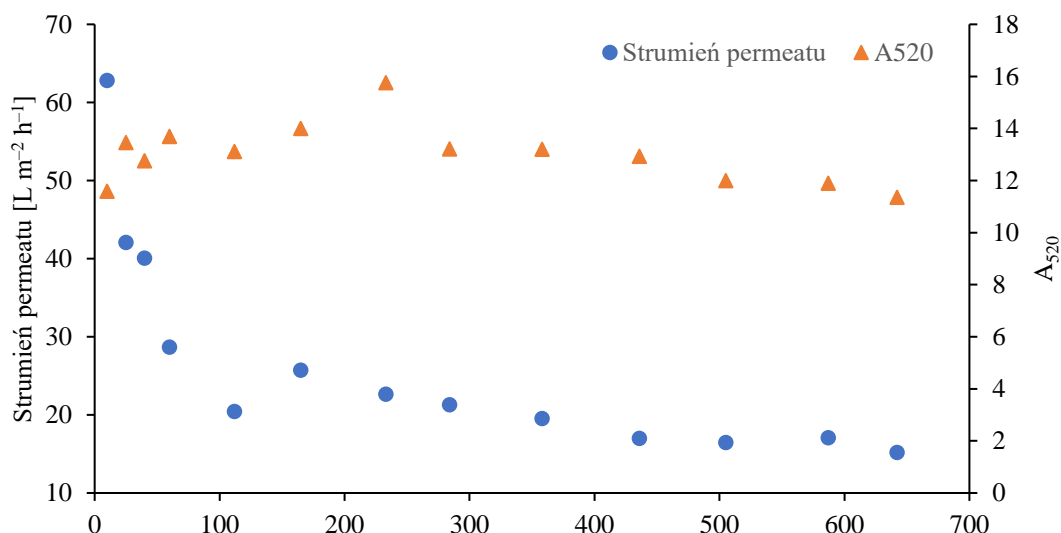
Podobnie jak w przypadku ekstraktu z owoców bzu czarnego, są to zawartości znacznie przekraczające typową standaryzację dla ekstraktów o wysokiej zawartości antocyjanów wynoszącą 25% [160]. Zawartości antocyjanów we wszystkich trzech ekstraktach po separacji chromatograficznej są znacznie wyższe od typowej, zgodnej z Farmakopeą Europejską, standaryzacji dla ekstraktu z borówki czarnej wynoszącej 36% antocyjanów [192,193]. Odzysk antocyjanów podanych na kolumnę, we frakcji głównej, jest najwyższy spośród ekstraktów z analizowanych surowców roślinnych i wynosił od 94,7% do 97,1%.

### 7.3. Separacja antocyjanów z wykorzystaniem technik membranowych

#### 7.3.1. Mikrofiltracja

Do próby mikrofiltracji wykorzystano jednokanałową membranę 0,45 $\mu\text{m}$  oraz ekstrakt z wytlóków aronii. Nadawa zawierała 323,0  $\pm$ 4,4 mg antocyjanów L<sup>-1</sup> i suchą masę 2,01 $\pm$ 0,10%. Otrzymany w trakcie filtracji permeat charakteryzował się tylko o 3,1% niższą zawartością antocyjanów (313,3 $\pm$ 4,1 mg L<sup>-1</sup>) i nieznacznie niższą suchą masą wynoszącą 1,90 $\pm$ 0,09%. Zawartość antocyjanów w retentacie wzrosła o 5% i wynosiła 329,1 $\pm$ 4,9 mg antocyjanów L<sup>-1</sup>.

Absorbancja permeatu przy  $\lambda=520$  nm wahała się w granicach 10-16 AU z niewielką tendencją spadkową od ok. 230 minuty. Strumień permeatu spadał od 63 L m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> na początku filtracji do ok. 15 L m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> w końcowej części procesu (Rysunek 21). Zawartość antocyjanów w permeacie była tylko o 3% niższa od zawartości w nadawie. W pracy Lachowicz i współpracowników [123] analizowano zawartość antocyjanów i innych polifenoli w soku z aronii poddawanym mikrofiltracji na różnych membranach ceramicznych. Stwierdzono spadek zawartości antocyjanów w soku o 17,3% na membranie 0,8  $\mu\text{m}$  i o 19,5% na membranie 0,2  $\mu\text{m}$ . Różnica w wynikach może być spowodowana zakwaszeniem badanego ekstraktu co zwiększa rozpuszczalność antocyjanów w wodzie [185,194]. Potwierdzają to wyniki Meng i współpracowników [194], dotyczące ekstrakcji i separacji membranowej antocyjanów z pachnotki bazyliowatej, w której do ekstrakcji stosowano kwasy organiczne i mineralne. Zakwaszony ekstrakt poddawano mikrofiltracji na membranie ceramicznej 0,2  $\mu\text{m}$  i następnie zagęszczaniu z zastosowaniem odwróconej osmozy. Badacze nie stwierdzili spadku zawartości sumy antocyjanów ani sumy izoflawonów na etapie mikrofiltracji.



Rysunek 21. Zmiany przepływu i absorbancji w trakcie mikrofiltracji na jednokanałowej membranie 0,45 $\mu$ m przy ciśnieniu transmembranowym 5 barów.

Z powodu braku efektu zateżenia antocyjanów i suchej masy, zrezygnowano z dalszych badań dotyczących zastosowania MF jako metody separacji antocyjanów. Mikrofiltracja może zostać wykorzystana do wstępnej filtracji, przed zastosowaniem UF lub NF, a także do zimnej sterylizacji ekstraktów i soków [123,194,195].

### 7.3.2. Ultrafiltracja

Badania z zakresu ultrafiltracji wykonano przy stałym natężeniu przepływu retentatu, wynoszącym  $600 \pm 20 L h^{-1}$ , w temperaturze  $30 \pm 2^{\circ}C$  oraz ciśnieniu transmembranowym  $5 \pm 0,2$  bara. Nadawę w każdym przypadku zagęszczano 20-krotnie i przeprowadzono 2-krotną diafiltrację, dodając za każdym razem ilość wody równą ilości retentatu. Po każdej próbie zbierano cały permeat oraz retentat i przemywano układ wodą w celu odmycia antocyjanów z układu. W próbkach permeatu, retentatu oraz retentatu z przemycia układu oznaczano objętość, masę, zawartość antocyjanów i suchą masę każdej z próbek. Stratę antocyjanów w permeacie oznaczano jako ilość antocyjanów w permeacie względem ilości antocyjanów odzyskanych po procesie.

W Tabeli 11 przedstawiono podsumowanie wyników z ultrafiltracji na membranach o MWCO wynoszącym od 1-5 kDa. Strata antocyjanów aronii w permeacie na membranie o MWCO 5 kDa wyniosła 35,3%. Co ciekawe, bardzo zbliżone wyniki uzyskano stosując membranę o MWCO 1 kDa. Obie membrany umożliwiają podwyższenie zawartości

antocyjanów w suchej masie ekstraktu z aronii do około 14,5%, mimo różnych zawartości w suchej masie nadawy wynoszących 2,04% i 2,52% odpowiednio dla membrany 3 kDa i 5 kDa. Ilość antocyjanów w permeatach z ultrafiltracji na membranach o MWCO 1 kDa wynosiła odpowiednio dla membrany ceramicznej i polimerowej 20,3% i 18,8% antocyjanów z nadawy. Końcowa zawartość antocyjanów w suchej masie retentatu była niższa niż retentatów otrzymanych na membranach o MWCO 5 i 3 kDa i wynosiła 12,50 i 13,55% odpowiednio dla membrany ceramicznej i polimerowej.

Tabela 11. Wyniki ultrafiltracji na membranach o wybranych MWCO. Proces prowadzono przy ciśnieniu transmembranowym  $5 \pm 0,2$  bar, w temperaturze  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ . Natężenie przepływu nadawy dla membran polimerowych wynosiło  $1200 \pm 50$  L h<sup>-1</sup>, dla membran ceramicznych  $110 \pm 10$  L h<sup>-1</sup>.

MWCO	Rodzaj membrany	Strata antocyjanów w permeacie [%]	Zawartość antocyjanów w suchej masie nadawy [%]	Zawartość antocyjanów w suchej masie retentatu [%]
<b>EKSTRAKT Z ARONII</b>				
5kDa	Ceramiczna INSIDE CéRAM™	35,3	2,51±0,21	14,54±0,14
3 kDa	Ceramiczna INSIDE CéRAM™	34,6	2,04±0,23	14,38±0,15
1 kDa	Ceramiczna INSIDE CéRAM™	20,3	1,97±0,22	12,50±0,13
1 kDa	Ceramiczna INSIDE CéRAM™	18,8	2,11±0,20	13,55±0,16
<b>EKSTRAKT Z OWOCÓW BZU CZARNEGO</b>				
3 kDa	Ceramiczna INSIDE CéRAM™	22,2	2,97±0,27	16,14±0,18
1 kDa	Ceramiczna INSIDE CéRAM™	4,3	3,18±0,22	13,40±0,18
1 kDa	Polimerowa (PES) XT MAX	11,4	2,84±0,24	14,97±0,14
<b>EKSTRAKT Z OWOCÓW BORÓWKI CZARNEJ</b>				
1 kDa	Ceramiczna INSIDE CéRAM™	20,2	1,54±0,21	12,08±0,11

Antocyjany aronii mają masę cząsteczkową od 419,4 do 449,2 Da, a bzu czarnego od 449,2- 743,6. Z tego powodu interesujące jest wyjaśnienie zatrzymywania znacznej części



antocyjanów przez membrany o MWCO >1 kDa. Zatrzymywanie antocyjanów i innych flawonoidów na membranach o MWCO większych od 5 kDa stwierdzili również inni autorzy dla soków i ekstraktów z innych surowców roślinnych. Chung i współautorzy [196] zaobserwowali zatrzymywanie przez membranę o MWCO 6 kDa ok. 75-85% antocyjanów z ekstraktu z pachnotki bazyliowej. Retencja antocyjanów zależała od zawartości suchej masy, pH oraz ciśnienia transmembranowego. Autorzy pracy jako prawdopodobną przyczynę zatrzymywania większości antocyjanów przez membranę o MWCO znacznie większym od masy cząsteczkowej antocyjanów podali kopigmentację z innymi polifenolami. Jest to zjawisko obserwowane jako zmiana (najczęściej podwyższenie) absorpcji antocyjanów z niewielkim przesunięciem maksimum absorpcji. Przyczyną kopigmentacji są niekowalencyjne oddziaływania antocyjanów z cząsteczkami kopigmentów takich jak flawonoidy i inne polifenole, kwasy organiczne czy też same antocyjany. Cząsteczki antocyjanów oddziałują między sobą oraz z innymi cząsteczkami za pomocą oddziaływań hydrofobowych,  $\pi$ - $\pi$  i wodorowych [60,197].

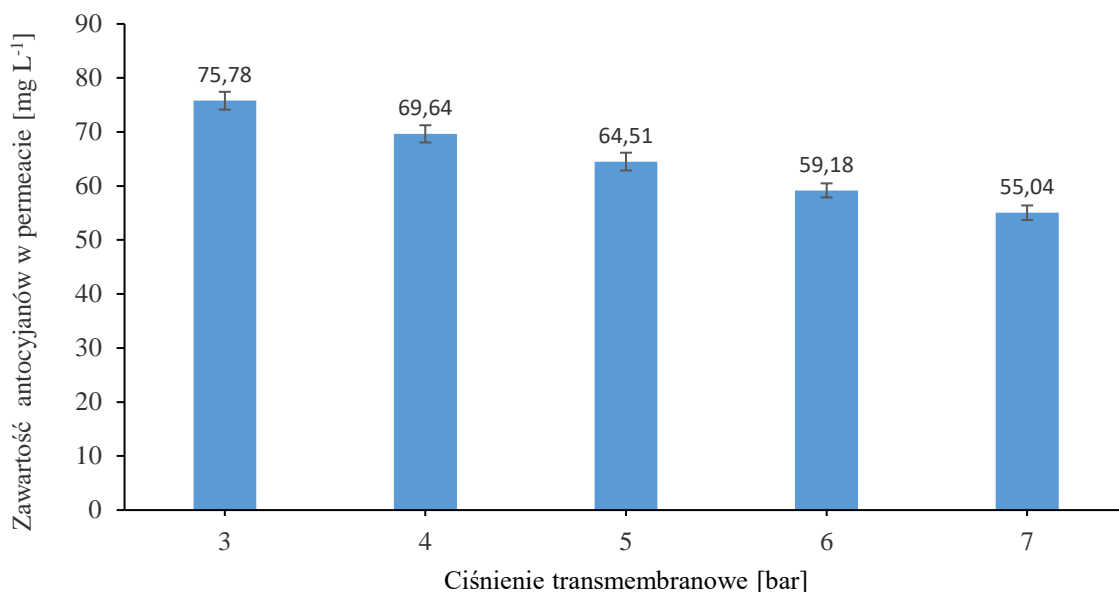
Z kolei Pap i współpracownicy [198] badali ultrafiltrację soku z czarnej porzeczki na membranie o MWCO 100 kDa. W porównaniu z nadawą, zawartość antocyjanów w permeacie spadła o 50% a flawonoli o 46%. Spadek zawartości flawonoidów, mających masę cząsteczkową zbliżoną do antocyjanów, o 42% stwierdzono w soku z opuncji figowej nawet na membranie o MWCO wynoszącym 200 kDa [199]. Kolejną, oprócz kopigmentacji, przyczyną retencji antocyjanów na membranach ultrafiltracyjnych może być oddziaływanie z pektynami i innymi polisacharydami. Wykazano to porównując retencję czystego roztworu antocyjanów oraz roztworu antocyjanów w obecności pektyn. Mieszaniny antocyjanów z pektynami wykazywały, zależną od rodzaju pektyn i pH, podwyższoną retencję na membranach o MWCO wynoszącym 30 kDa [171,200].

Do dalszych badań wytypowano membranę o MWCO wynoszącym 1 kDa i ekstrakt z owoców bzu czarnego.

### **Wpływ ciśnienia transmembranowego i temperatury na zawartość antocyjanów w strumieniu permeatu**

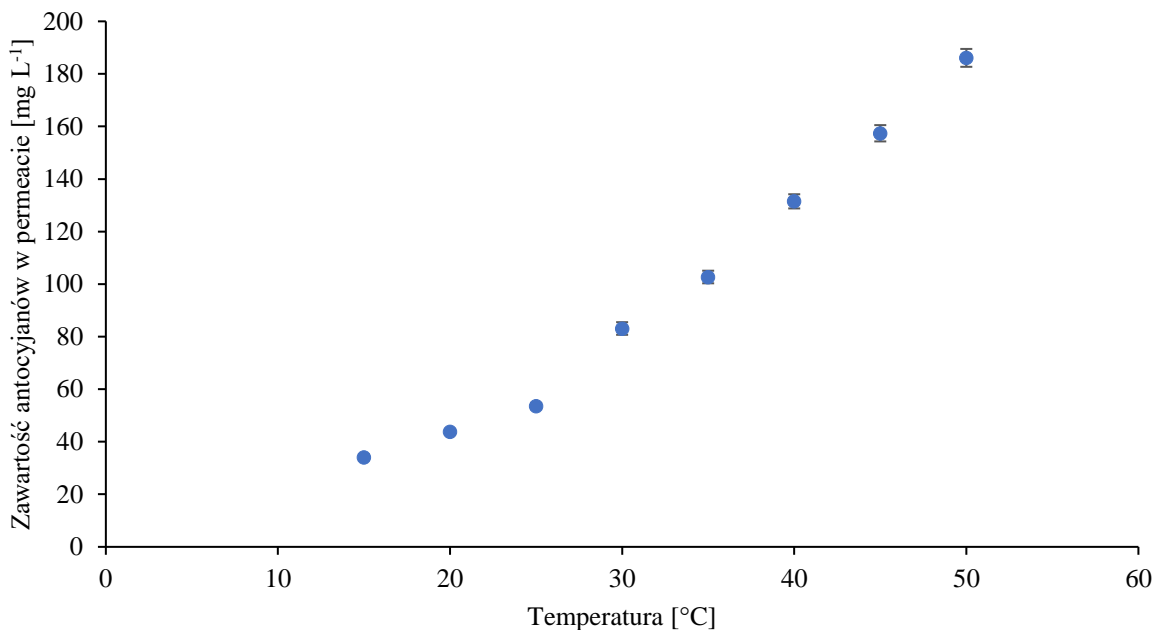
Wpływ ciśnienia transmembranowego i temperatury na zawartość antocyjanów w permeacie i związane z tym straty antocyjanów zbadano na przykładzie ekstraktu z owoców bzu czarnego o zawartości antocyjanów 642 mg L<sup>-1</sup> i membranie polimerowej o MWCO 1 kDa recyrkulując permeat. Utrzymywano stały przepływ nadawy przez moduł wynoszący 1250±40 L h<sup>-1</sup>. Dane zaprezentowane na Rysunku 22 wskazują, że wzrost ciśnienia transmembranowego

spowodował podwyższenie retencji antocyjanów. Podobne zjawisko zaobserwowano w badaniach Chung'a i współpracowników [196] dla ekstraktu z pachnotki bazyliowatej oraz Cissé i współpracowników dla ekstraktu z hibiskusa [97]. Wyższą retencję antocyjanów przy wyższym ciśnieniu transmembranowym tłumaczy się zmniejszeniem średnicy porów wskutek odkształcania membrany polimerowej [97].



Rysunek 22. Wpływ ciśnienia transmembranowego na zawartość antocyjanów w strumieniu permeatu. Membrana XT MAX 1 kDa, temperatura 25°C.

Wpływ temperatury na zawartość antocyjanów w permeacie zbadano przy ciśnieniu transmembranowym wynoszącym 7 bar. Do badania zastosowano ekstrakt zawierający 642 mg L<sup>-1</sup> antocyjanów.



Rysunek 23. Wpływ temperatury na zawartość antocyjanów w strumieniu permeatu na membranie XT MAX 1 kDa.

Permeacja antocyjanów rośnie wraz ze wzrostem temperatury (Rysunek 23). Zawartość antocyjanów w permeacie była najniższa w najniższej z analizowanych temperatur wynoszącej 15°C i wynosiła 34,1 mg L<sup>-1</sup> i rosła aż do 186,1 mg L<sup>-1</sup> w temperaturze 50°C. Utrzymywanie temperatury <25°C prawdopodobnie nie będzie możliwe w warunkach produkcyjnych. Wyniki badań wskazują, że w skali produkcyjnej należy utrzymywać możliwie najniższą temperaturę. Praca w stosunkowo niskiej temperaturze w przypadku separacji polifenoli a w szczególności antocyjanów jest również korzystna z powodu obniżenia ich stabilności w wysokiej temperaturze [127].

### **Wpływ diafiltracji na zawartość antocyjanów w suchej masie retentatu**

W celu usunięcia z filtrowanego roztworu substancji balastowych i zwiększenia zawartości antocyjanów w suchej masie ekstraktu, zbadano wpływ procesu diafiltracji na zawartość antocyjanów w suchej masie ekstraktu. Diafiltracja polega na dodawaniu rozpuszczalnika, w tym przypadku wody, do retentatu i ponownego zagęszczania retentatu. Umożliwia to lepsze oczyszczenie retentatu z substancji penetrujących przez membranę. Dzięki temu procesowi można zwiększyć zawartość antocyjanów w suchej masie ekstraktu, zmniejszyć stężenie jonów, cukrów i innych substancji o niskiej masie cząsteczkowej. Dodatkowo, obniżenie stężenia cukrów w retentacie ułatwia wysuszenie ekstraktu. Cukry

charakteryzują się niską temperaturą zeszklenia ( $T_g$ ), dzięki czemu obniżenie ich stężenia w suszonym materiale ułatwia wysuszenie produktu [148].

Przeprowadzono 10-krotne zateżenie nadawy na membranie polimerowej o MWCO wynoszącym 1 kDa. Ultrafiltrację prowadzono w następujących warunkach: temperatura 25°C, ciśnienie transmembranowe 7 barów oraz stały przepływ nadawy – 1250 L h<sup>-1</sup>. Retentat zateżono do objętości około 10 L i dodawano 5 L wody dejonizowanej. Po zebraniu 5 L permeatu, w kolejnym cyklu diafiltracji, do zbiornika procesowego dodawano kolejne 5 L wody destylowanej. W próbkach retentatu, pobieranych po każdym cyklu diafiltracji, oznaczano zawartość antocyjanów, suchą masę, przewodność i pH. Retentat po sześciu cyklach diafiltracji zagęszczono na wyparce próżniowej do suchej masy 34% i wysuszono w suszarce próżniowej. Suchy ekstrakt nie był plastyczny i nie przyklejał się do tacki suszarki. Wskazuje to na takie obniżenie zawartości cukrów w ekstrakcie, które umożliwia wysuszenie ekstraktu.

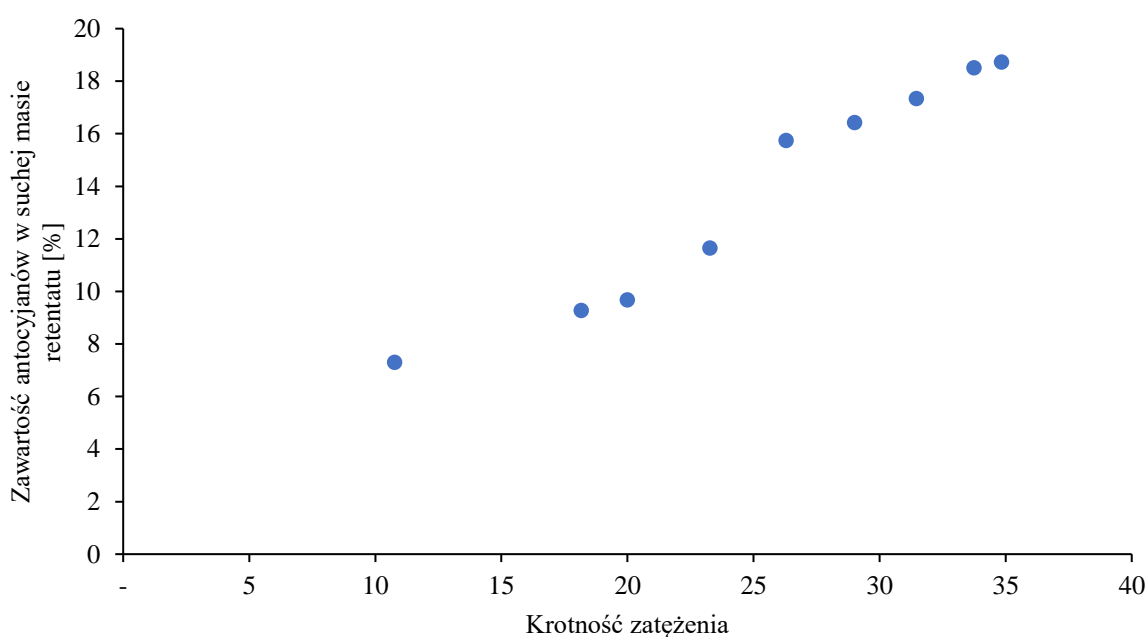
Tabela 12. Wpływ diafiltracji na zawartość antocyjanów, suchą masę, pH oraz przewodność retentatu.

	Zawartość antocyjanów w [mg L <sup>-1</sup> ]	Sucha masa [%]	pH	Przewodność [mS cm <sup>-1</sup> ]	Zawartość antocyjanów w suchej masie retentatu [%]
Nadawa	673±9	3,45±0,12	2,50	3,26	1,95±0,07
Retentat przed diafiltracją	2 813±27	5,65±0,14	2,58	3,84	4,98±0,13
Retentat po 1 cyklu diafiltracji	2 846±37	5,00±0,13	2,63	3,32	5,69±0,15
Retentat po 2 cyklu diafiltracji	2 832±37	3,85±0,13	2,68	3,03	7,35±0,26
Retentat po 3 cyklu diafiltracji	2 845±37	3,53±0,11	2,76	2,67	8,07±0,35
Retentat po 4 cyklu diafiltracji	2 832±37	3,03±0,11	2,81	2,37	9,33±0,56
Retentat po 5 cyklu diafiltracji	2 803±37	2,16±0,09	2,88	2,11	12,97±0,78
Retentat po 6 cyklu diafiltracji	2 774±36	1,91±0,08	2,95	1,94	15,36±0,63

Wyniki diafiltracji przedstawione w Tabeli 12 wskazują na wzrost zawartości antocyjanów po każdym z sześciu cykli diafiltracji. Przy 10-krotnym zateżeniu nadawy oraz sześciu cyklach diafiltracji możliwe jest otrzymanie ekstraktu o zawartości antocyjanów w suchej masie wynoszącej co najmniej 15%.

## Wpływ stopnia zateżenia na zawartość antocyjanów w suchej masie retentatu

W celu zbadania wpływu stopnia zateżenia ekstraktu na membranę polimerowej o MWCO wynoszącym 1 kDa na zawartość antocyjanów w suchej masie ekstraktu przeprowadzono ultrafiltrację, pobierając próbki retentatu w określonym czasie. Zastosowane warunki to temperatura 25°C, ciśnienie transmembranowe wynoszące 7 barów oraz przepływ nadawy w module – 1250 L h<sup>-1</sup>. W zbiorniku procesowym utrzymywano stałą objętość retentatu wynoszącą około 30 L, dozując równocześnie nadawę za pomocą pompy perystaltycznej. Dozowanie nadawy regulowano zależnie od wskazań przepływomierza wskazującego przepływ permeatu.



Rysunek 24. Zależność zawartości antocyjanów od stopnia zateżenia nadawy na membranę XT MAX 1 kDa.

Wyniki przedstawione na Rysunku 24 wskazują na wzrost zawartości antocyjanów wraz z zateżeniem ekstraktu co najmniej do 34-krotnego zateżenia ekstraktu. Zwiększenie stopnia zateżenia ekstraktu, bez zastosowania diafiltracji, umożliwia podwyższenie zawartości antocyjanów w suchej masie ekstraktu do co najmniej 18%.

### 7.3.3. Nanofiltracja

W celu zbadania separacji antocyjanów na membranach nanofiltracyjnych zastosowano membranę ceramiczną, o MWCO wynoszącym 450 Da i polimerową membranę NF270 o MWCO 200-400 Da. Membrana NF270 posiada warstwę selektywną uformowaną z poliamidu.

Membrana NF270 zatrzymywała 100% antocyjanów, a ceramiczna 450 Da 98,6% antocyjanów. Z uwagi na zwartą morfologię membran NF, 20-krotne zateżenie badanych ekstraktów umożliwiło jedynie nieznaczny wzrost zawartości antocyjanów w suchych masach ekstraktów. Końcowe zawartości antocyjanów w suchych masach wyniosły jedynie od 1,85 do 4,05% (Tabela 13). Najmniejszy wzrost zawartości antocyjanów w suchej masie ekstraktu wyniósł niecałe 5% dla ekstraktu z bzu czarnego z wykorzystaniem membrany NF270. Najwyższy wzrost zawartości antocyjanów w suchej masie wyniósł 58% dla ekstraktu z aronii i membrany ceramicznej (MWCO=450 Da). Ponadto, próby wysuszenia otrzymanych retentatów w suszarni rozpyłowej nie powiodły się. Suche ekstrakty były plastyczne i kleiły się do ścianek suszarki. Świadczy to o zatrzymywaniu cukrów prostych przez membrany nanofiltrycyjne. Wysoka zawartość cukrów prostych jest główną przyczyną przyklejania się ekstraktu do ścian suszarki rozpyłowej [153].

W związku z tym nie kontynuowano dalszych prób separacji ekstraktów na membranach nanofiltrycyjnych.

Tabela 13. Wyniki nanofiltracji. Proces prowadzono przy ciśnieniu transmembranowym = 5 ±0,3 bar (membrana ceramiczna) i 15±1 bar (membrana polimerowa), w temperaturze 30±2°C.

Membrana/ MWCO	Rodzaj membrany	Strata antocyjanów w permeacie [%]	Zawartość antocyjanów w suchej masie nadawy [%]	Zawartość antocyjanów w suchej masie retentatu [%]
<b>EKSTRAKT Z ARONII</b>				
NF270 /270 Da	Polimerowa	<LOD	2,18	2,46
450 Da	Ceramiczna	1,4	1,74	2,76
<b>EKSTRAKT Z BZU CZARNEGO</b>				
NF270 /270 Da	Polimerowa	<LOD	3,85	4,05
<b>EKSTRAKT Z BORÓWKI CZARNEJ</b>				
NF270 /270 Da	Polimerowa	<LOD	1,54	1,85

#### 7.4. Wyniki badań biologicznych ekstraktów

Suche ekstrakty, opracowane w ramach niniejszych badań, są wprowadzane do oferty firmy Greenvit. Ekstrakty te są stosowane głównie w suplementach diety. W celu potwierdzenia w warunkach *in vitro*, ich właściwości przeciwzapalnych, przeciwutleniających i cytostatycznych oraz porównania z opublikowanymi do tej pory badaniami, przeprowadzono wstępne badania biologiczne, na komórkach hodowlanych. W przypadku ekstraktu z aronii badania te dotyczyły właściwości przeciwzapalnych i przeciwutleniających *in vitro*. W przypadku ekstraktu z owoców bzu czarnego badania miały na celu sprawdzenie wpływu na proliferację komórek niektórych nowotworów oraz jednojądrzastych komórek krwi obwodowej.

##### 7.4.1. Badanie cytotoksyczności ekstraktu z aronii

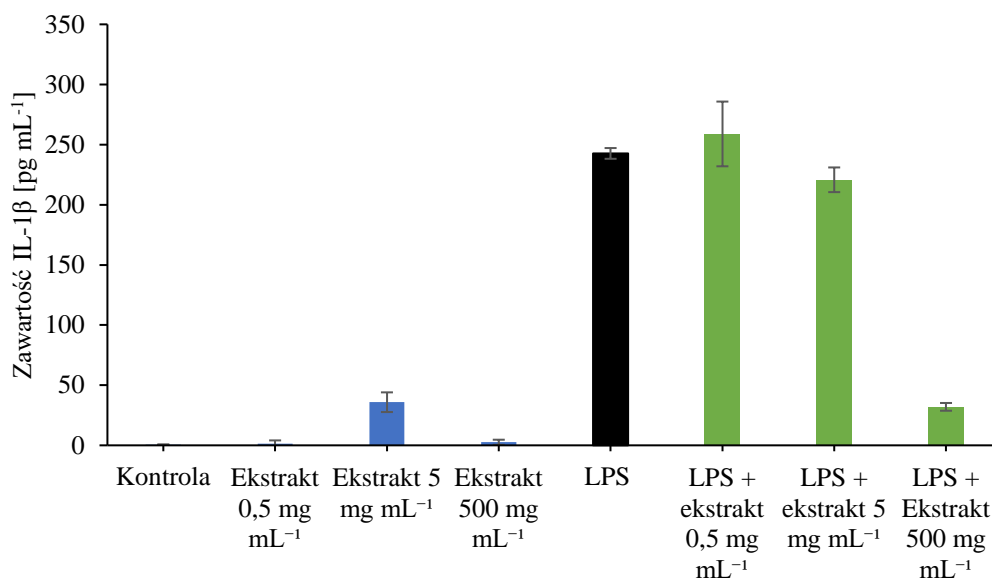
Test MTT jest szeroko stosowany do badania cytotoksyczności substancji w eksperymentach z udziałem linii komórkowych [7,49,50]. Wyniki testu MTT przedstawiono w Tabeli 14. Wyniki uzyskane dla różnych stężeń ekstraktów są zbliżone do próbki kontrolnej (0,277), dzięki czemu wykazano, że suchy ekstrakt z aronii jest bezpieczny dla komórek RAW264.7 we wszystkich analizowanych stężeniach. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic dla żadnego z analizowanych stężeń ekstraktów w porównaniu z próbą kontrolną (Tabela 14).

Tabela 14. Wyniki testu MTT dla suchego ekstraktu z aronii.

	Próbka			
	Kontrola	Ekstrakt 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Ekstrakt 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Ekstrakt 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Wynik testu MTT (jako A <sub>563</sub> )	0,277±0,018	0,279±0,017	0,279±0,009	0,281±0,006

##### 7.4.2. Wpływ ekstraktu z aronii na czynnik martwicy nowotworów $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) i interleukinę 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) w stymulowanych LPS komórkach RAW 264.7

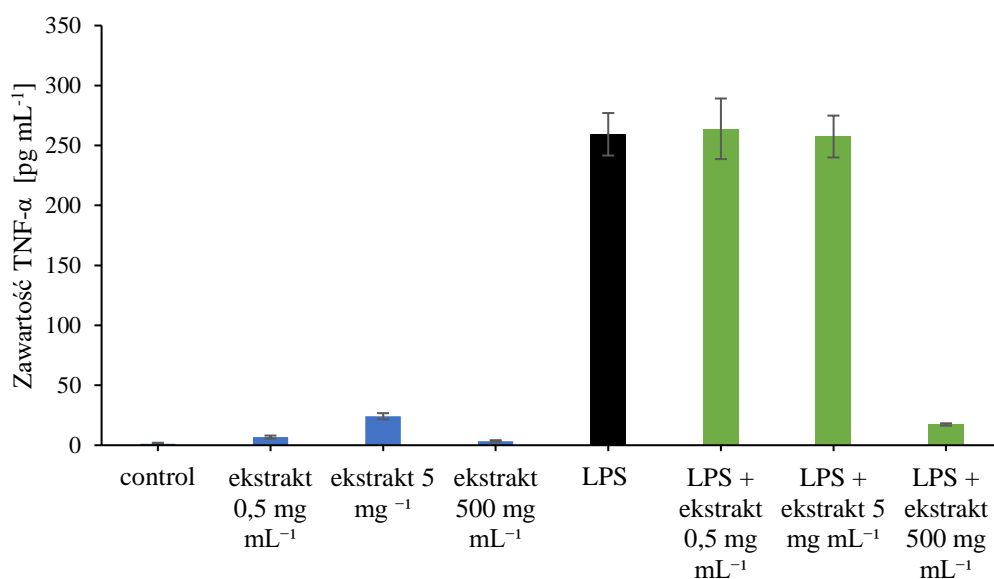
Według danych literaturowych czyste antocyjany mają właściwości przeciwzapalne *in vitro* i *in vivo* [201,202]. Stymulacja komórek RAW 264.7 przez LPS znacząco zwiększa produkcję czynników zapalnych – interleukiny 1 beta (IL-1 $\beta$ ) oraz czynnika martwicy nowotworów alfa (TNF- $\alpha$ ) [24].



Rysunek 25. Wpływ suchego ekstraktu z aronii i LPS na sekrecję IL-1 $\beta$  przez komórki RAW264.7.

Dane przedstawione na Rysunkach 25 i 26 wskazują, że wzrost ten był znacznie mniejszy dla komórek, do których dodano ekstrakt z aronii w stężeniu 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Jednak wśród testowanych stężeń ekstraktu z aronii czarnoowocowej tylko dodatek 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  spowodował znaczny spadek obu markerów stanu zapalnego w porównaniu z komórkami traktowanymi LPS (lipopolisacharydem). Różnice między kontrolą a komórkami traktowanymi LPS+500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ekstraktu były w obu przypadkach statystycznie nieistotne, co oznacza, że suchy ekstrakt z aronii w stężeniu 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  całkowicie hamował prozapalne działanie lipopolisacharydu.

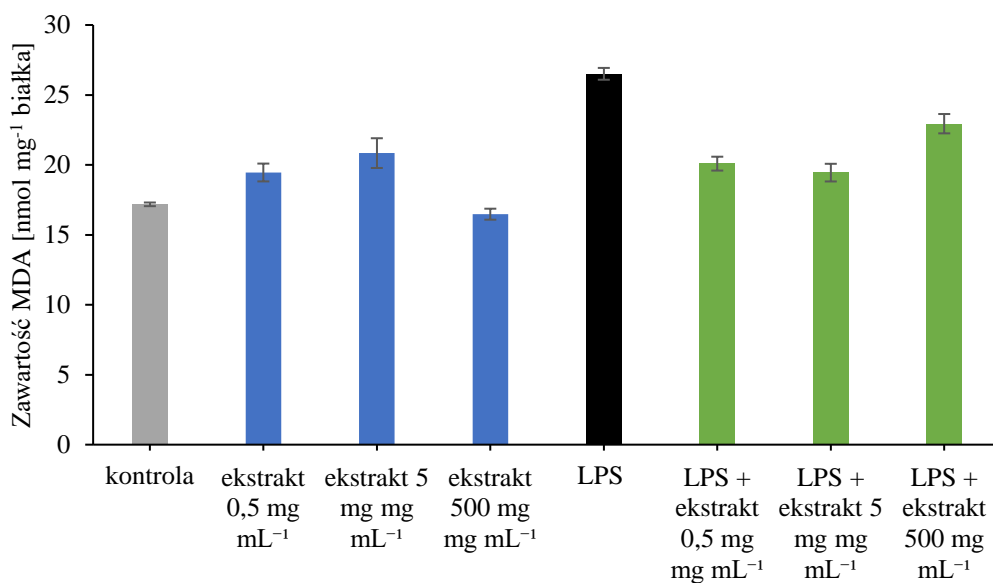




Rysunek 26. Wpływ suchego ekstraktu z aronii i LPS na sekrecję TNF- $\alpha$  przez komórki RAW264.7.

#### 7.4.3. Wyniki badania wpływu ekstraktu z aronii na peroksydację lipidów metodą MDA

Dialdehyd malonowy (MDA) jest jednym z powszechnie oznaczanych markerów stresu oksydacyjnego. Jest to produkt peroksydacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) [203].



Rysunek 27. Wpływ suchego ekstraktu z aronii na peroksydację lipidów mierzona za pomocą testu MDA.

Dane przedstawione na Rysunku 27 wskazują, że LPS powodował wzrost peroksydacji lipidów *in vitro*. Ekstrakt z aronii czarnoowocowej osłabiał ten efekt. Co ciekawe, niższe stężenia ekstraktu z aronii silniej hamowały peroksydację lipidów od wyższych stężeń tego ekstraktu (Rysunek 27). Jest to zgodne z wynikami innych badaczy pokazującymi, że ekstrakty bogate w antocyjany, m.in. açai lub fioletowego słodkiego ziemniaka w zbyt wysokich stężeniach mogą mieć działanie prooksydacyjne [204,205]. W badaniach przeprowadzonych przez Kardum i wsp. [206] na zdrowych ochotnikach stwierdzono, że bogaty w polifenole sok z aronii znacząco zmniejsza peroksydację lipidów, oznaczaną jako substancje reagujące z kwasem tiobarbiturowym (TBARS). Inne ekstrakty i soki bogate w antocyjany (m.in. borówka czarna, czarna porzeczka i czarny bez) również powodowały istotne obniżenie poziomu stresu oksydacyjnego *in vitro* i *in vivo* [49,207,208].

#### 7.4.4. Wyniki badania cytotoksyczności ekstraktów z owoców bzu czarnego wobec różnych komórek nowotworowych

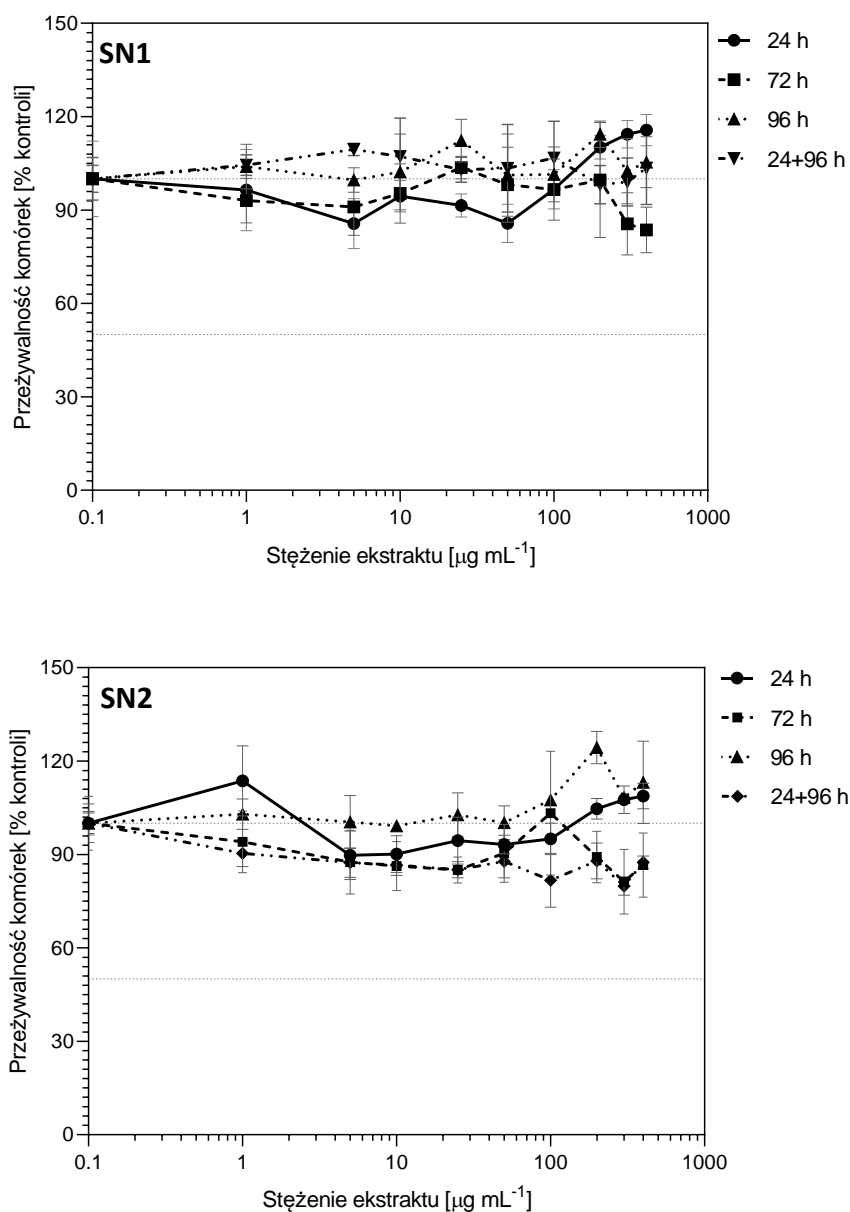
Do badań wykorzystano 2 ekstrakty suche z owoców bzu czarnego. Suchy ekstrakt SN1 został wyprodukowany z zastosowaniem separacji na polimerowej membranie ultrafiltracyjnej o MWCO 1 kDa. Z kolei ekstrakt SN2 został wyprodukowany z zastosowaniem separacji chromatograficznej, na żywicy Sepabeads SP700. Zawartość wybranych składników obu ekstraktów przedstawiono w Tabeli 15.

Tabela 15. Zawartość wybranych składników ekstraktów z bzu czarnego, wykorzystanych do badań na komórkach hodowlanych.

Numer partii	Suma polifenoli w przeliczeniu na katechinę [wt.%]	Antocyjany w przeliczeniu na 3-O-glukozyd cyjanidyny (HPLC) [wt.%]	Antocyjany w przeliczeniu na 3-O-glukozyd cyjanidyny (UV-VIS) [wt.%]	Rutyna (HPLC) [wt.%]	3-O-glukozyd kwercetyny [wt.%]
SN1	20,52 +/- 0,53	14,47 +/- 0,39	15,24 +/- 0,39	0,87 +/- 0,09	0,13 +/- 0,03
SN2	48,55 +/- 1,78	33,13 +/- 0,62	34,28 +/- 0,78	4,59 +/- 0,16	0,55 +/- 0,08

Wpływ dwóch partii suchego ekstraktu z czarnego bzu (EDE) na proliferację różnych linii komórkowych badano za pomocą testu MTT. Zastosowano wielokrotne stężenia ekstraktów, a dawki skuteczne, wyrażone jako wartość IC50, określono na podstawie krzywej dawka-odpowieź. Zgodnie z Rysunkami 28-32, partie SN1 i SN2 ekstraktu z czarnego bzu wykazywały różny potencjał cytotoksyczny w stosunku do badanych linii komórkowych.

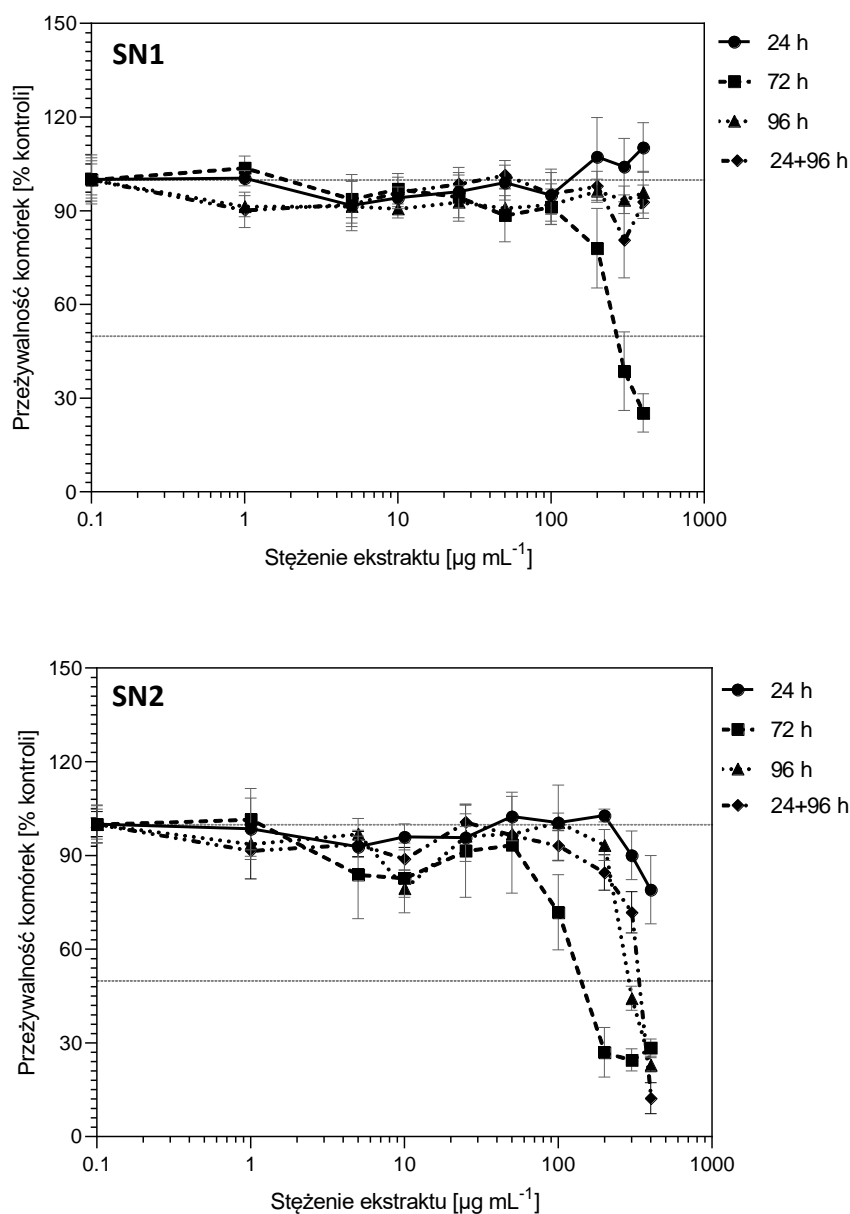
Jedynie wobec komórek A-549 stwierdzono, że oba ekstrakty z bzu czarnego nie wykazywały żadnej aktywności w teście MTT (rysunek 28).



Rysunek 28. Przeżywalność komórek w teście MTT: wpływ EDE na ludzkie komórki A-549 (komórki raka płuc). (separacja na membranie UF). Suchy ekstrakt SN1 został wyprodukowany z zastosowaniem separacji na polimerowej membranie UF o MWCO 1 kDa. Ekstrakt SN2 został wyprodukowany z zastosowaniem separacji chromatograficznej.

W przeciwieństwie do komórek A-549, w przypadku komórek A-2780 i MCF-7, oba ekstrakty powodowały zależny od dawki spadek żywotności komórek (Rysunek 28). Wartości  $IC_{50}$  wskazywały na silniejsze właściwości cytotoksyczne ekstraktu SN2, o czym świadczy niższa wartość  $IC_{50}$  wynosząca  $147 \mu\text{g mL}^{-1}$ , w porównaniu z  $247 \mu\text{g mL}^{-1}$ , oraz  $140 \mu\text{g mL}^{-1}$

w porównaniu z  $268 \mu\text{g mL}^{-1}$  dla A-2780 i MCF-7 odpowiednio, po inkubacji z ekstraktami przez 72 godziny (Tabela 16).



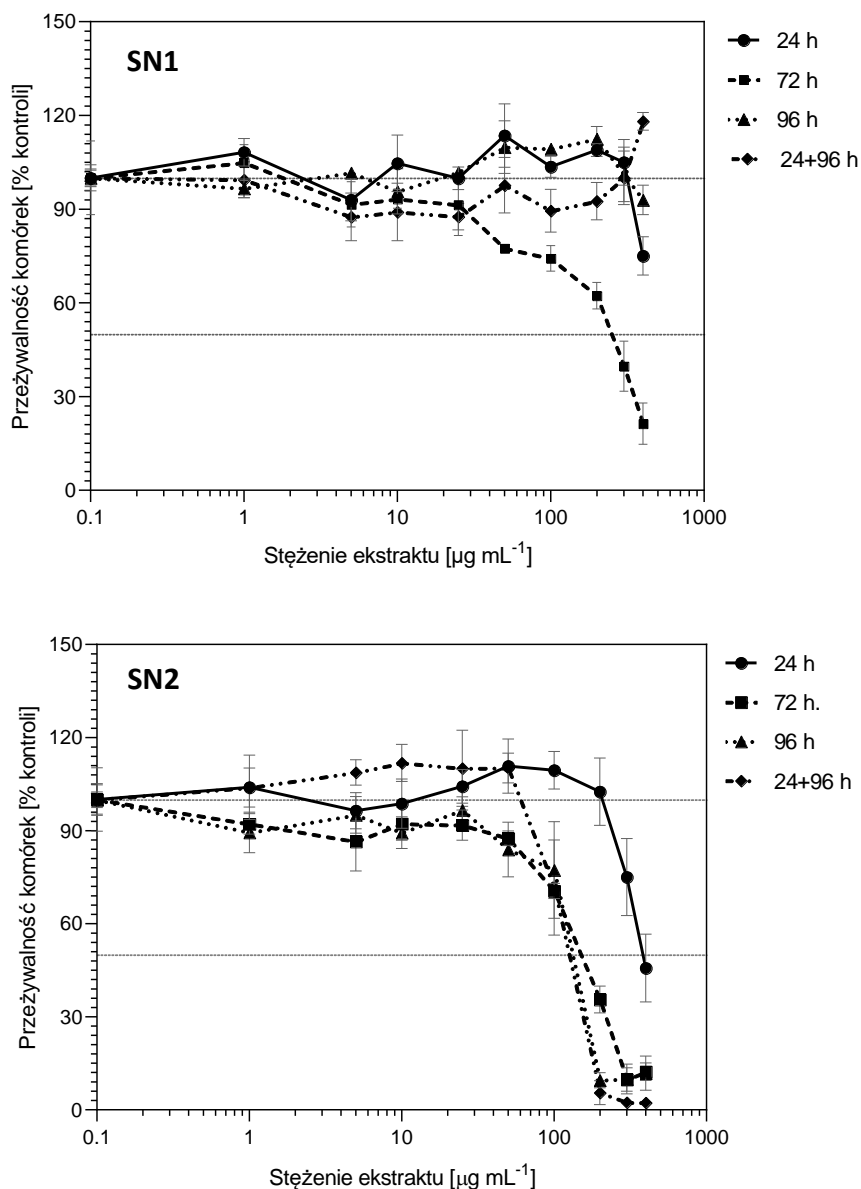
Rysunek 29. Przeżywalność komórek w teście MTT: wpływ EDE na ludzkie komórki MCF-7 (komórki raka sutka). Suchy ekstrakt SN1 został wyprodukowany z zastosowaniem separacji na polimerowej membranie UF o MWCO 1 kDa. Ekstrakt SN2 został wyprodukowany z zastosowaniem separacji chromatograficznej.

W innych okresach inkubacji ekstrakt SN1, nie wykazywał w ogóle, lub wykazywał jedynie niewielki, wpływ cytotoksyczny, zarówno na komórki raka jajnika, jak i raka piersi. Co ciekawe, ekstrakt SN2 zmniejszał żywotność komórek A-2780 i MCF-7 począwszy od 24 godzin inkubacji (Rysunek 29, Rysunek 30), wykazując silniejsze działanie hamujące w

stosunku do komórek raka jajnika, gdzie żywotność powyżej 72 godzin inkubacji spadła do około 10%.

Tabela 16. Wartości IC<sub>50</sub> dla ekstraktów z owoców bzu czarnego i badanych linii komórkowych. Znak – oznacza brak możliwości obliczenia IC<sub>50</sub>.

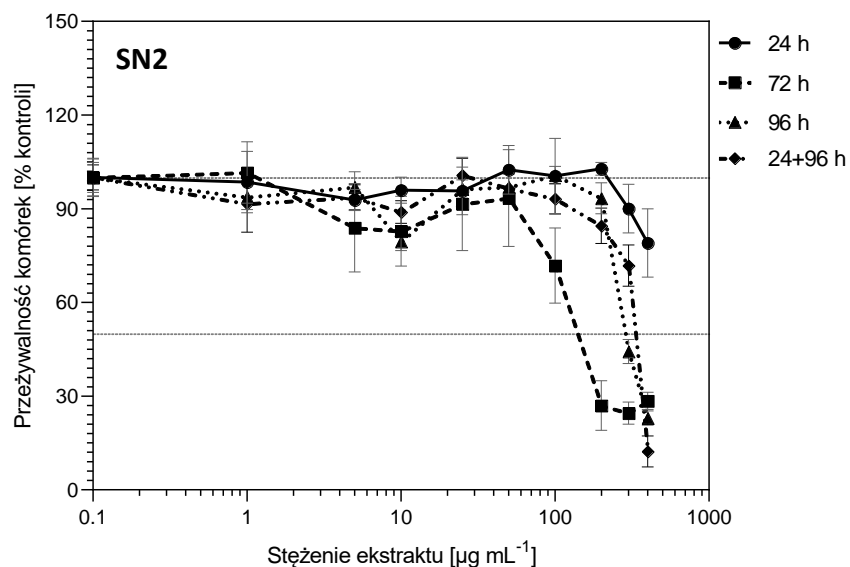
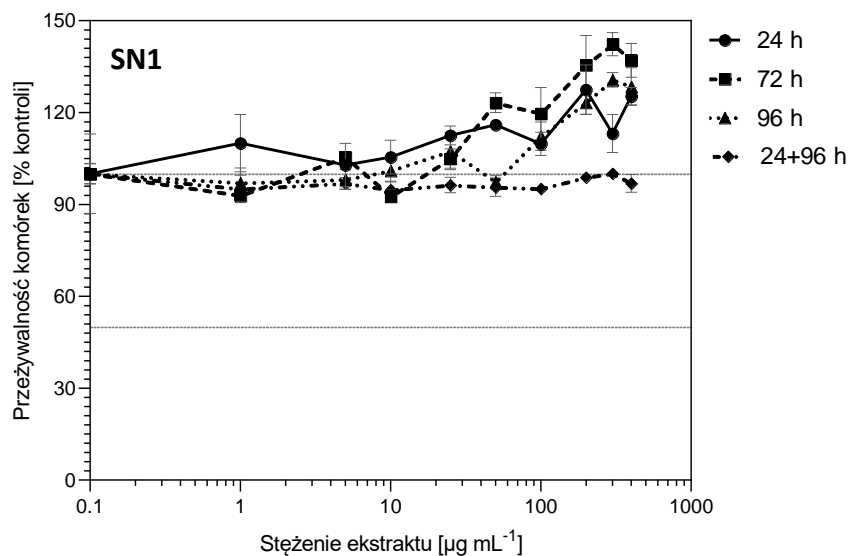
	24 h [μg*mL <sup>-1</sup> ]		72 h [μg*mL <sup>-1</sup> ]		96 h [μg*mL <sup>-1</sup> ]		24 + 96 h [μg*mL <sup>-1</sup> ]	
	SN1	SN2	SN1	SN2	SN1	SN2	SN1	SN2
A-549	-	-	-	-	-	-	-	-
A-2780	-	-	247	147	-	132	-	-
MCF-7	-	-	268	140	299	-	-	330
HCT-116	-	372	-	347	-	354	-	324



Rysunek 30. Przeżywalność komórek w teście MTT: wpływ EDE na ludzkie komórki A-2780 (komórki raka jajnika). Suchy ekstrakt SN1 został wyprodukowany z zastosowaniem separacji na polimerowej membranie UF o MWCO 1 kDa. Ekstrakt SN2 został wyprodukowany z zastosowaniem separacji chromatograficznej.

Najbardziej znaczącą różnicę we właściwościach cytotoksycznych obu ekstraktów wykazano dla komórek raka okrężnicy, HCT-116 (Rysunek 31). Podczas gdy ekstrakt SN1 nie wykazywał działania hamującego we wszystkich czasach inkubacji i zakresach stężeń, ekstrakt SN2 silnie hamował proliferację komórek do około 45% począwszy od 24 godzin inkubacji. Co więcej, ekstrakt SN1 wykazywał właściwości stymulujące proliferację w stosunku do HCT-116, począwszy od stężenia  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  po 24 i 72 godzinach inkubacji. Na uwagę zasługuje fakt, że wypłukanie pożywki z ekstraktem SN2 po 24 h wstępnej inkubacji i zastąpienie jej

świeżą żywnością bez ekstraktu, a następnie 96 h inkubacji skutkowało podobną aktywnością jak stała inkubacja z ekstraktem dla 96 godz. Wskazuje to, że działanie cytotoksyczne ekstraktów rozpoczyna się w ciągu pierwszych 24 godzin inkubacji, a dłuższa inkubacja potęguje ten efekt. Konieczne są dalsze badania w celu wyjaśnienia tego zjawiska, ponieważ może ono być związane z przemianą metaboliczną ekstraktu w komórkach i indukcją/inhibicją białek transportujących przez błonę komórkową.



Rysunek 31. Przeżywalność komórek w teście MTT: wpływ EDE na komórki HTC-116 (komórki raka okrężnicy). Suchy ekstrakt SN1 został wyprodukowany z zastosowaniem separacji na polimerowej membranie UF o MWCO 1 kDa. Ekstrakt SN2 został wyprodukowany z zastosowaniem separacji chromatograficznej.

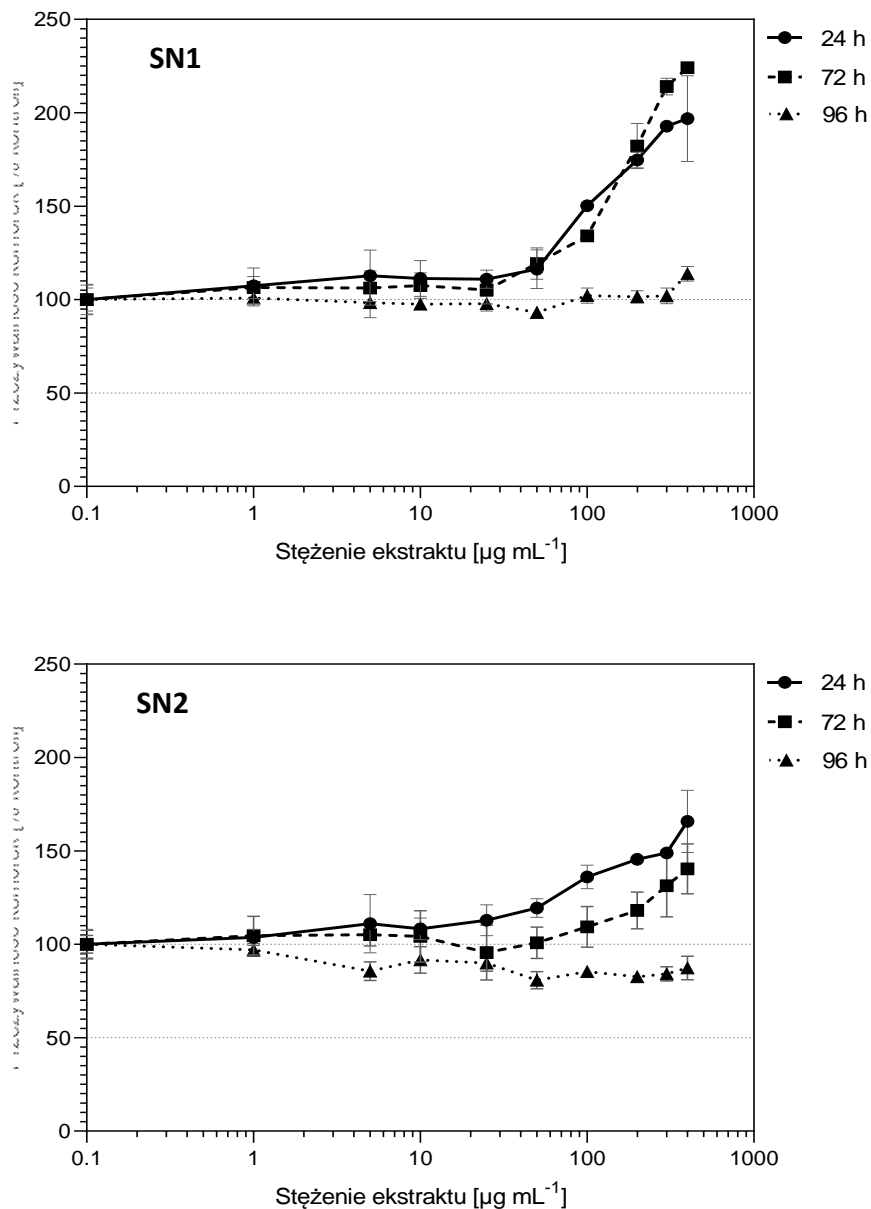
Przykładem ekstraktu będącego przedmiotem badań przeciwnowotworowych jest ekstrakt z kwiatu hibiskusa [209]. Główny antocyjan obecny w ekstrakcie z kwiatu hibiskusa, 3-O-sambubiozyd cyjanidyny, występujący również w znacznej ilości w owocach czarnego bzu. W badaniach Maciela i wsp. [210] wykazano, że wzrost komórek HepG-2, Caco-2 i A-549 był hamowany zarówno przez ekstrakt z hibiskusa, jak i frakcję antocyjanów. Jednak w tym badaniu nie stwierdzono aktywności ekstraktów z czarnego bzu w stosunku do komórek



A-549. Wskazuje to na selektywność naturalnych ekstraktów wobec poszczególnych linii komórek nowotworowych. Opracowane w ramach niniejszej rozprawy, ekstrakty z czarnego bzu wykazywały również selektywność pod względem potencjału cytotoksycznego. Komórki raka jajnika, piersi i okrężnicy były bardziej wrażliwe na oba ekstrakty z czarnego bzu niż komórki raka płuc. Selektywność naturalnych ekstraktów w stosunku do różnych linii komórek nowotworowych została również stwierdzona przez Pereira i wsp. [211]. Wykazali, że frakcje ekstraktów z kwiatów *Sambucus nigra* wykazywały aktywność cytotoksyczną wobec komórek raka pęcherza moczowego (T24), ale nie w normalnych ludzkich komórkach nabłonka płuc MRC-5. Cytotoksyczność ekstraktów bogatych w antocyjany została również opisana w innych liniach komórkowych [212–214]. Kwasy triterpenoidowe, np. kwas ursolowy, są składnikami owoców czarnego bzu, które również wywierają działanie cytotoksyczne na komórki nowotworowe [215]. Substancje te są jednak praktycznie nierozpuszczalne w wodzie, dlatego ekstrakty nie powinny zawierać tych substancji. Lektyny są również wymieniane jako substancje czynne w ekstraktach z czarnego bzu [216]. Ekstrakt SN2, otrzymany z udziałem separacji chromatograficznej, nie powinien zawierać lektyn w ich natywnej postaci. Białka, w tym lektyny, są denaturowane wysokimi stężeniami alkoholu [217], a w przypadku ekstraktu SN2 do elucji zastosowano wysokoprocentowy alkohol etylowy.

#### **7.4.5. Wyniki badania cytotoksyczności ekstraktów z owoców bzu czarnego wobec zdrowych komórek krwi obwodowej (PBMC)**

Cytotoksyczność ekstraktów z czarnego bzu została również przetestowana w stosunku do zdrowych jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC). Są to komórki zaangażowane w przeciwnowotworową odpowiedź immunologiczną. Dane przedstawione na Rysunku 32 pokazują, że oba ekstrakty, w stężeniach od  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , stymulowały proliferację komórek PBMC. Silniejsze właściwości stymulujące zaobserwowano dla ekstraktu SN2, gdzie po 72 h inkubacji żywotność osiągnęła około 230% , wobec około 170% dla ekstraktu SN1. Co ciekawe, w przypadku obu ekstraktów inkubacja z komórkami przez 96 godzin prawie nie miała wpływu na proliferację komórek.



Rysunek 32. Przeżywalność komórek w teście MTT: wpływ EDE na komórki PBMC (jednojądrzaste komórki krwi obwodowej). Suchy ekstrakt SN1 został wyprodukowany z zastosowaniem separacji na polimerowej membranie UF o MWCO 1 kDa. Ekstrakt SN2 został wyprodukowany z zastosowaniem separacji chromatograficznej.

PBMC są mieszaniną różnych prawidłowych komórek krwi, wśród których znajdują się limfocyty, monocyty i makrofagi, czyli komórki układu odpornościowego. Stymulujący wpływ ekstraktów EDE na proliferację PBMC może potwierdzać stymulujący wpływ na układ odpornościowy [218,219]. Barak wsp. [219] wykazali, że ekstrakt z czarnego bzu *Sambucol* aktywował zdrowy układ odpornościowy poprzez znaczne zwiększenie produkcji cytokin zapalnych (IL-1 beta, TNF-alfa, IL-6, IL-8). Ekstrakty z czarnego bzu mogą zatem być

korzystne dla aktywacji układu odpornościowego w procesie zapalnym u osób zdrowych lub u pacjentów z różnymi chorobami, w tym z rakiem. W badaniach nad polifenolami z czerwonego i białego wina stwierdzono działanie cytotoksyczne zarówno wobec komórek rakowych, jak i komórek PBMC. Co ciekawe, polifenolowe ekstrakty wina i resweratrol wykazywały słabszy efekt cytotoksyczny na PBMC niż na linie komórek nowotworowych [220]. Ponadto Ampasavate i wsp. [221] wykazali, że różne ekstrakty owocowe o wysokim potencjale antyoksydacyjnym miały silny wpływ cytotoksyczny na komórki białaczki HL60, ale nie były toksyczne dla normalnych PBMC. Fan i wsp. [222] wykazali w badaniach *in vivo*, że ekstrakt antocyjanów czarnego ryżu promował populację komórek PBMC. W innym badaniu Decendit i in. [223] wykazali, że 3-O-glukozyd malwidyny, główny antocyjan winogron, jest bioaktywny i nie wykazuje toksyczności wobec ludzkich komórek PBMC.

## 8. Wydajność prób produkcyjnych

Na podstawie prób wykonanych w skali laboratoryjnej opracowano założenia technologiczne do przeprowadzenia testów w skali produkcyjnej. Próby produkcyjne wykonano na surowcach różniących się zawartością antocyjanów.

W Tabeli 17 przedstawiono wydajności prób produkcyjnych z podziałem na poszczególne etapy procesu produkcyjnego. Wydajność obliczano na każdym etapie procesu obliczano z Równania nr 4:

$$\text{wydajność etapu} = \frac{\text{ilość antocyjanów na końcowym etapie procesu [kg]} \times 100\%}{\text{ilość antocyjanów na początkowym etapie procesu [kg]}} \quad (4)$$

Z kolei wydajność całego procesu obliczano z Równania nr 5:

$$\text{wydajność produkcji} = \frac{\text{ilość antocyjanów w surowcu użytym do produkcji [kg]} \times 100\%}{\text{ilość antocyjanów w suchym ekstrakcie [kg]}} \quad (5)$$

Oprócz partii S1 suchego ekstraktu z owoców bzu czarnego, całkowity odzysk antocyjanów w każdej z partii produkcyjnych przekraczał 75%. Najwyższą wydajność całego procesu produkcyjnego otrzymano dla suchego ekstraktu z owoców borówki czarnej. W tym przypadku uzyskano wydajności całego procesu produkcyjnego od 87,6 aż do 96,5% (Tabela 17).

Tabela 17. Wydajność prób produkcyjnych. S1-S5 – partie produkcyjne suchego ekstraktu z bzu czarnego; A1-A4 - partie produkcyjne suchego ekstraktu z aronii; V1-V5 - partie produkcyjne suchego ekstraktu z borówki czarnej.

Numer Partii	Zawartość Antocyjanów w surowcu [%]	Wydajność Ekstrakcji [%]	Wydajność Separacji chromatograficznej [%]	Wydajność Zagęszczania [%]	Wydajność suszenia [%]	Wydajność całego procesu [%]
<b>Suchy ekstrakt z owoców bzu czarnego</b>						
S1	0,30±0,01	89,6	96,7	101,8	75,1	65,1
S2	0,35±0,01	100,1	98,4	98,3	92,9	91,4
S3	0,49±0,02	96,2	b.d.	100,0	93,4	89,9
S4	0,55±0,02	92,2	92,2	92,4	91,0	77,5
S5	0,61±0,02	100,0	90,1	89,3	97,7	78,5
<b>Suchy ekstrakt z owoców aronii</b>						
A1	0,55±0,02	102,1	84,0	96,7	98,8	81,9
A2	0,40±0,01	97,7	97,3	85,9	99,9	81,5
A3	0,48±0,02	94,0	97,6	93,2	95,4	81,6
A4	0,54±0,02	98,1	89,7	96,9	100,0	85,3
<b>Suchy ekstrakt z owoców borówki czarnej</b>						
V1	0,54±0,02	95,2	98,2	97,4	101,0	92,0
V2	0,50±0,02	94,6	96,0	99,0	97,4	87,6
V3	0,48±0,02	103,4	97,1	96,9	99,2	96,5
V4	0,41±0,02	97,5	97,3	94,9	98,0	88,2
V5	0,39±0,02	95,8	100,0	98,9	99,2	93,7

## 9. Charakterystyka chemiczna i porównanie składu ekstraktów

W ramach wdrażania wytwarzania nowych produktów wyprodukowano próbne partie produkcyjne suchych, standaryzowanych ekstraktów. Zidentyfikowano charakterystyczne składniki dla każdego z badanych

### 9.1. Suchy ekstrakt z aronii

W Tabeli 18 przedstawiono wyniki analizy ilościowej antocyjanów i polifenoli w dziewięciu partiach pilotażowych i produkcyjnych suchego ekstraktu z aronii.

Mimo niemal takiej samej metody produkcji wszystkich rodzajów ekstraktów zawartości antocyjanów i polifenoli różnią się znacznie pomiędzy poszczególnymi partiami. Co ciekawe, nie ma prostej korelacji pomiędzy zawartością antocyjanów w surowcu (owoców lub wyciekach) a zawartością antocyjanów w ekstraktach (Tabela 18).

Spośród dziewięciu analizowanych partii pilotażowych i produkcyjnych, trzy z nich charakteryzowały się zawartością antocyjanów niższą od standaryzacji na 25% antocyjanów. Odpowiednio wysoką standaryzację można osiągnąć mieszając partie o zawartości wyższej od 25% z partiami o niższym poziomie. Zawartość antocyjanów tylko w jednej z dziewięciu partii (B2) była niższa od 20%.

Różnica pomiędzy zawartością antocyjanów oznaczoną bardziej specyficzną metodą HPLC a szybką metodą UV-VIS tylko w przypadku jednej partii (B2) przekraczała 5%. Partia ta charakteryzowała się również najwyższym stosunkiem sumy polifenoli do antocyjanów wynoszącym 4,2. W pozostałych partiach produkcyjnych wartość tego parametru wahała się między 2,07 a 3,57. Dwie kolejne partie produkcyjne (A3 i A4), z największą różnicą pomiędzy wynikiem HPLC a UV-VIS, charakteryzowały się wysokim, w porównaniu do innych partii, stosunkiem sumy polifenoli do antocyjanów, wynoszącym odpowiednio 3,6 i 3,2. Wskazuje to, że główną przyczyną różnicy pomiędzy dwiema metodami analitycznymi może być kopigmentacja. Jest to zjawisko objawiające się zmianą, najczęściej podwyższeniem, absorbancji antocyjanów przez bezbarwne kopigmenty [60,197].

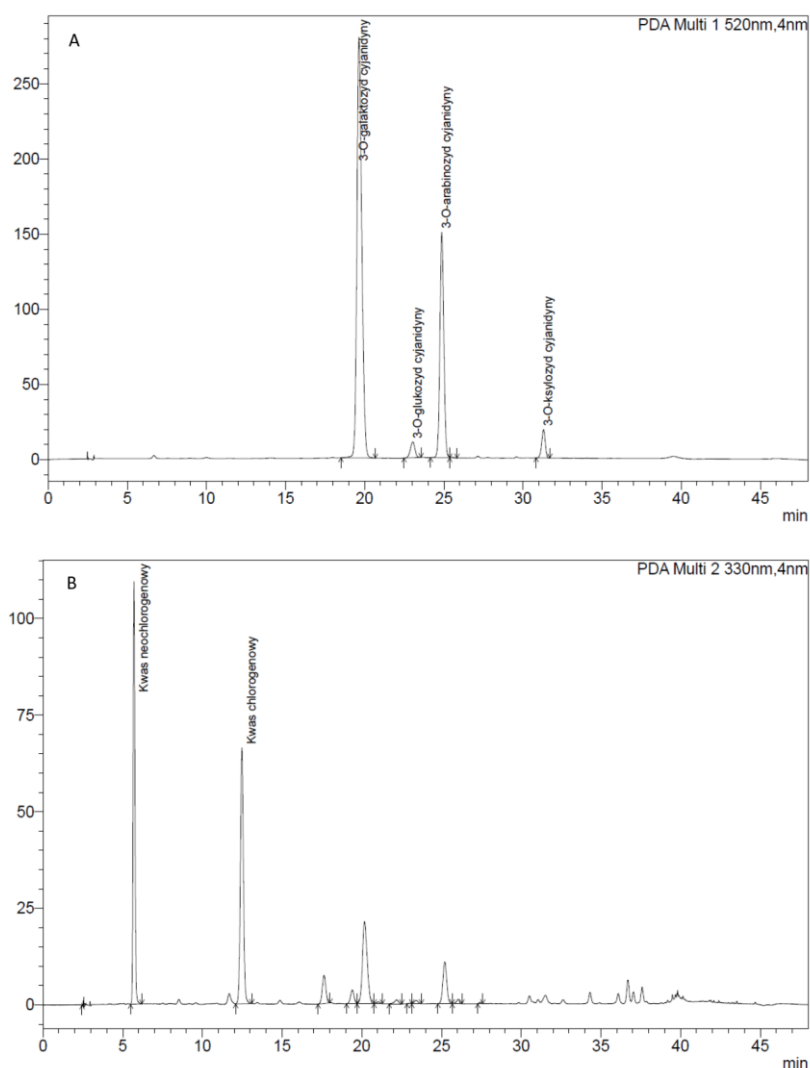
Tabela 18. Zawartość antocyjanów i polifenoli w partiach produkcyjnych suchego ekstraktu z aronii. Suche ekstrakty B1 i B2 oczyszczano na kolumnie o objętości 20 L. Suche ekstrakty A1-A7 oczyszczano na kolumnie o objętości 1100 L. Numery partii A1-A4 odpowiadają numerom A1-A4 z Tabeli 14.

Numer Partii	Surowiec/ Zawartość Antocyjanów [wt%]	Antocyjany jako Cy-3- glu (HPLC) [wt%]	Antocyjany jako Cy-3- glu (UV-VIS) [wt%]	Różnica procentowa HPLC vs. UV-VIS	Polifenole jako katechina (UV-VIS) [wt%]	Stosunek polifenoli do antocyjanów
B1	Wytłoki 1,02%	33,10±0,28	32,54±0,28	1,69	68,73±1,95	2,1
B2	Wytłoki 0,61%	14,47±0,12	16,58±0,13	12,73	60,30±1,63	4,2
A1	Owoce 0,55%	26,97±0,23	27,70±0,22	2,64	76,53±2,07	2,8
A2	Owoce 0,55%	27,02±0,23	27,55±0,22	1,92	75,21±2,11	2,8
A3	Wytłoki 0,5%	21,27±0,18	23,50±0,26	4,62	75,85±2,13	3,6
A4	Owoce 0,55%	21,64±0,18	23,51±0,26	3,86	68,48±1,92	3,2
A5	Owoce 0,40%	29,68±0,25	28,43±0,23	2,53	66,34±1,74	2,2
A6	Owoce 0,48%	30,61±0,25	28,72±0,23	2,91	68,52±1,93	2,2
A7	Owoce 0,54%	25,63±0,22	27,36±0,22	2,77	75,12±2,11	2,9

Kahkonen współpracownicy [224] zastosowali do ekstrakcji owoców aronii 70% aceton. Do separacji zastosowali użyli technikę SPE (Solid Phase Extraction). Autorzy uzyskali suchy ekstrakt o zawartości polifenoli wynoszącej 40,1% oznaczanych metodą Folina-Ciocalteu. Autorzy nie oznaczyli jednak zawartości antocyjanów w przygotowanym ekstrakcie. Wang i współpracownicy [225] zastosowali ekstrakcję zakwaszonym 70% etanolem i dwuetapowe oczyszczanie antocyjanów przy użyciu dwóch żywic (Amberlite XAD-7 i Sephadex LH-20) uzyskując suchy ekstrakt z aronii o zawartości ok. 50% antocyjanów. Jest to zawartość znacznie wyższa niż uzyskana w omawianych badaniach, jednak zastosowanie ekstrakcji etanolowej i dwuetapowego oczyszczania znacznie zwiększa koszt produkcji i wymaga bardziej skomplikowanej linii produkcyjnej.

Profile antocyjanów i kwasów fenolowych przedstawione na Rysunku 33 są zgodne z danymi literaturowymi i mogą służyć do weryfikacji autentyczności owoców, wytlóków czy

soku, a także ekstraktu z aronii [8,10,226]. Profil chromatograficzny antocyjanów każdym przypadku charakterystyczny dla aronii i wykazywał obecność czterech glikozydów cyjanidyny, tj. 3-galaktozydu, 3-glukozydu, 3-arabinozydu i 3-ksylozydu (Rysunek 33 A). Wszystkie wyprodukowane ekstrakty zawierały również kwasy chlorogenowy i neochlorogenowy (Rysunek 33 B), które są głównymi kwasami fenolowymi różnych odmian *A. melanocarpa* [1,158].



Rysunek 33. Profil suchego ekstraktu aronii, rozdzielonego za pomocą HPLC. Chromatogram zarejestrowano przy A 520 i B 330 nm.



## 9.2. Suchy ekstrakt z owoców bzu czarnego

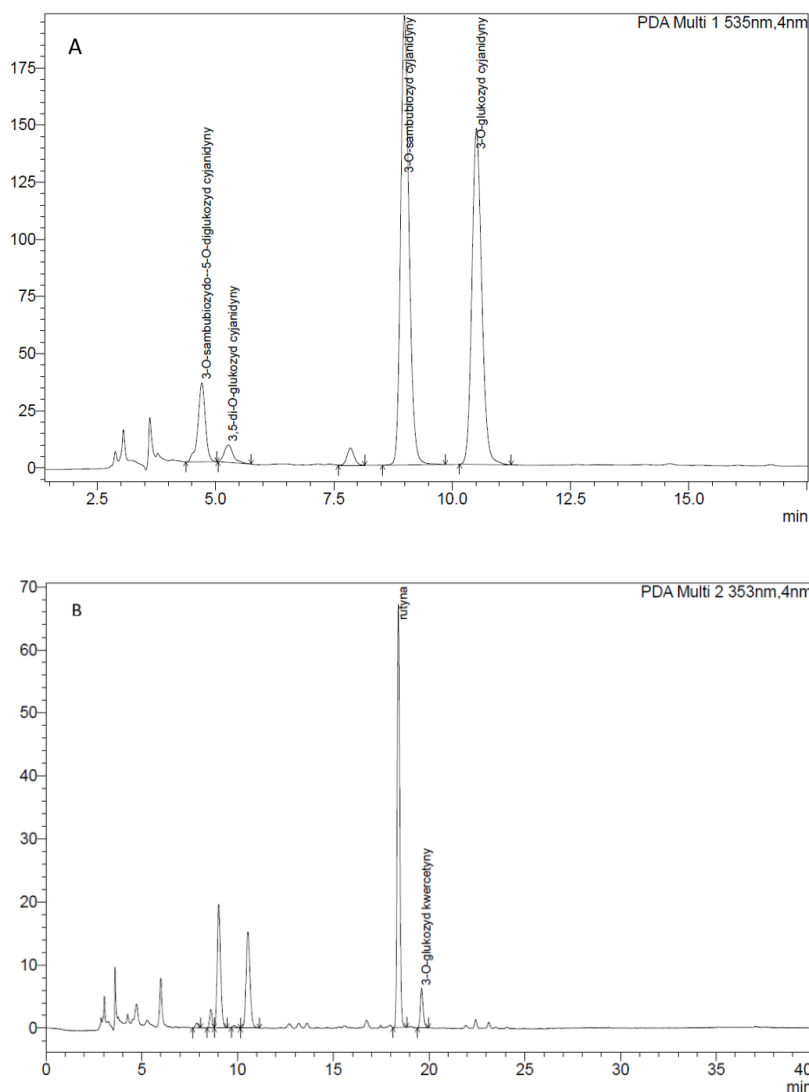
Z powodu słabej dostępności wyłoków z owoców bzu czarnego wszystkie partie produkcyjne wytworzono z mrożonego owoców bzu czarnego. Analizowane partie suchego ekstraktu z owoców bzu czarnego charakteryzowały się różną zawartością antocyjanów, wahającą się w granicach 18,73-34,34% (Tabela 19).

Tabela 19. Zawartość antocyjanów i polifenoli w partiach produkcyjnych suchego ekstraktu z owoców bzu czarnego. S1-S5 – partie produkcyjne suchego ekstraktu z bzu czarnego.

Numer Partii	Zawartość Antocyjanów w surowcu [wt%]	Antocyjany jako Cy-3-glu (HPLC) [wt%]	Antocyjany jako Cy-3-glu (UV-VIS) [wt%]	Różnica procentowa HPLC vs. UV-VIS	Polifenole jako katechina (UV-VIS) [wt%]	Stosunek polifenoli do antocyjanów
S1	0,30%	19,48±0,32	20,34±0,44	4,23	41,10	2,11
S2	0,35%	18,73±0,30	19,15±0,41	2,19	35,33	1,89
S3	0,49%	24,18±0,39	25,02±0,54	3,36	41,68	1,72
S4	0,55%	25,77±0,42	26,44±0,57	2,53	36,97	1,43
S5	0,61%	34,34±0,55	35,08±0,76	2,11	52,19	1,52

Trzy z pięciu suchych ekstraktów zawierały powyżej 25% antocyjanów. Z kolei wszystkie wyprodukowane partie spełniały podstawowe kryterium akceptacji podane w Farmakopei Amerykańskiej – zawierały co najmniej 17% antocyjanów. Podobnie jak w przypadku ekstraktów z aronii, obie metody zastosowane do ilościowej analizy antocyjanów (UV-VIS i HPLC), dają zbliżone wyniki. Różnica pomiędzy metodą HPLC i UV-VIS w przypadku żadnej z partii ekstraktu, nie przekraczała 5%, dzięki temu metodę UV-VIS można zastosować do szybkich analiz na różnych etapach procesu produkcyjnego. Stosunek polifenoli do antocyjanów był niższy niż w przypadku suchych ekstraktów z aronii i mieścił się w przedziale 1,43-2,11%.

Denev i wsp., [227], stosując metakrylową żywicę adsorpcyjną Amberlite XAD-7, otrzymali suchy ekstrakt z owoców bzu czarnego o zawartości antocyjanów 24,6% i polifenoli 28,3%. Ekstrakt ten charakteryzował się niższą proporcją polifenoli do antocyjanów (1,15%) w porównaniu z ekstraktami wyprodukowanymi w firmie Greenvit. Może to być spowodowane różną selektywnością żywic zastosowanych do separacji ekstraktów. Polimery metakrylowe są bardziej polarne od polimerów na bazie kopolimeru styren-DVB, co jest przyczyną różnej selektywności obu rodzajów żywic [228].



Rysunek 34. Profil suchego ekstraktu owoców bzu czarnego, rozdzielonego za pomocą HPLC. Chromatogram zarejestrowano przy A 520 i B 353 nm.

Profil chromatograficzny ekstraktów jest zgodny z danymi literaturowymi [229–231] oraz z monografią suchego ekstraktu z owoców bzu czarnego z Farmakopei Amerykańskiej [30]. W przypadku każdej z partii produkcyjnych profil ten był charakterystyczny dla antocyjanów *S. nigra* i wskazywał na obecność czterech glikozydów cyjanidyny, tj. cyjanidyno-3-O-sambubiozydo-5-O-glukozydu, cyjanidyno-3,5-di-O-glukozydu, cyjanidyno-3-O-sambubiozydu i cyjanidyno-3-O-glukozydu (Rysunek 34 A). W ekstraktach zidentyfikowano również glikozydy flawonoli - rutynę i 3-O-glukozyd kwercetyny (Rysunek 34 B), które są głównymi flawonolami różnych odmian bzu czarnego zarówno uprawnych jak i dzikich [232–234].

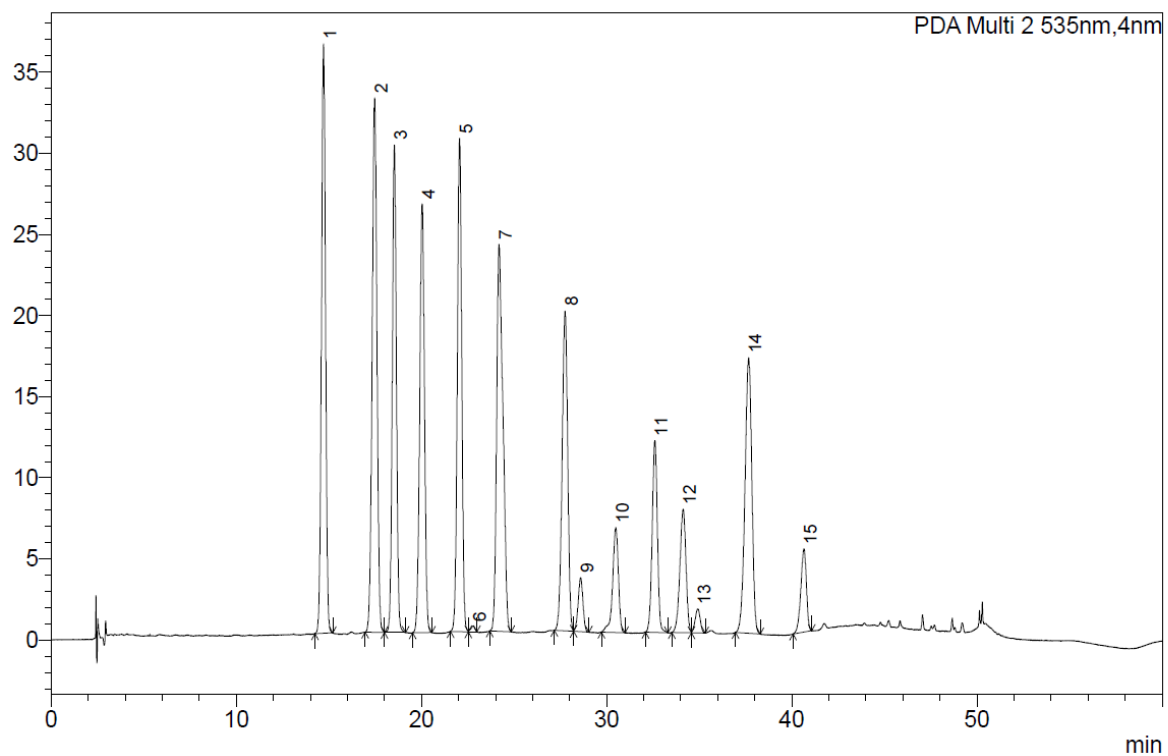
### 9.3. Suchy ekstrakt z borówki czarnej

Suche ekstrakty z owoców borówki czarnej charakteryzowały się najwyższą, spośród analizowanych ekstraktów, zawartością antocyjanów mieszczącą się w przedziale 43,98-49,55% (Tabela. 20). Co ciekawe, różnice pomiędzy wynikami analiz metodą UV-VIS i HPLC były najmniejsze ze wszystkich analizowanych ekstraktów suchych i w żadnej z pięciu partii produkcyjnych nie przekraczały 3%. Wszystkie analizowane partie suchego ekstraktu z borówki czarnej spełniały nie tylko warunek 25% zawartości antocyjanów, ale również wymaganą przez monografię suchego ekstraktu z owoców borówki czarnej z Farmakopei Europejskiej zawartość co najmniej 36% antocyjanów oznaczanych metodą HPLC.

Tabela. 20. Zawartość antocyjanów w partiach produkcyjnych suchego ekstraktu z borówki czarnej. B1-B5 – partie produkcyjne suchego ekstraktu z borówki czarnej.

Numer partii	Zawartość Antocyjanów w surowcu [wt%]	Antocyjany jako Cy-3-glu (UV-VIS) [wt%]	Antocyjany jako Cy-3-glu (HPLC) [wt%]	Różnica procentowa HPLC vs. UV-VIS
B1	0,54	49,55±1,77	51,86±1,46	2,58
B2	0,50	48,11±1,71	50,08±1,42	2,83
B3	0,48	46,46±1,61	47,12±1,37	1,40
B4	0,41	44,00±1,54	45,15±1,30	2,55
B5	0,39	43,98±1,51	44,17±1,30	0,43

Profil antocyjanów borówki czarnej jest najbogatszy spośród analizowanych ekstraktów roślinnych i zawiera aż 15 różnych substancji z tej grupy. Potwierdzenie profilu antocyjanów owoców i przetworów z owoców borówki czarnej jest szczególnie ważne ze względu na bardzo wysoki koszt zarówno surowca jak i ekstraktów oraz dużej popularności tych owoców. Fałszowanie owoców domieszką tańszych owoców jagodowych czy ekstraktów za pomocą wyciągów z tańszych owoców lub nawet syntetycznymi barwnikami są powszechne [44,235,236]. Na Rysunku 35 przedstawiono profil antocyjanów ekstraktu z owoców borówki czarnej wyprodukowanego w firmie Greenvit. Na podstawie monografii z Farmakopei Europejskiej i Farmakopealnego materiału odniesienia zidentyfikowano wszystkie 15 antocyjanów owoców borówki czarnej. Profil każdego z wyprodukowanych ekstraktów z borówki czarnej był zgodny z monografią z Farmakopei Europejskiej i z publikacjami [46,235,236].



Rysunek 35. Profil suchego ekstraktu z owoców borówki czarnej rozdzielonego za pomocą HPLC. Chromatogram zarejestrowano przy 535 nm. Identyfikacja pików:

- |    |                            |     |                           |
|----|----------------------------|-----|---------------------------|
| 1) | 3-O-galaktozyd delfinidyny | 9)  | 3-O-galaktozyd peonidyny  |
| 2) | 3-O-glukozyd delfinidyny   | 10) | 3-O-arabinozyd petunidyny |
| 3) | 3-O-galaktozyd cyjanidyny  | 11) | 3-O-glukozyd peonidyny    |
| 4) | 3-O-arabinozyd delfinidyny | 12) | 3-O-glukozyd malwidyny    |
| 5) | 3-O-galaktozyd cyjanidyny  | 13) | 3-O-arabinozyd peonidyny  |
| 6) | 3-O-galaktozyd petunidyny  | 14) | 3-O-glukozyd malwidyny    |
| 7) | 3-O-arabinozyd cyjanidyny  | 15) | 3-O-arabinozyd malwidyny  |
| 8) | 3-O-glukozyd petunidyny    |     |                           |

## **10. Wdrożenie wyników badań w firmie Greenvit**

Opracowane na podstawie niniejszych badań metody produkcji suchych ekstraktów standaryzowanych na wysoką zawartość antocyjanów zostały wdrożone do produkcji w firmie Greenvit. Dzięki temu firma obecnie oferuje ekstrakty z owoców i wyłoków z aronii oraz bzu czarnego, standaryzowane na co najmniej 25% antocyjanów. Wprowadzenie do oferty ekstraktów o tak wysokich standaryzacjach zwiększa konkurencyjność firmy w Polsce i za granicą. Suchy ekstrakt z owoców bzu czarnego będzie również oferowany w standaryzacji zgodnej z Farmakopeą Amerykańską, co zwiększy konkurencyjność firmy na rynku amerykańskim. Z kolei suchy ekstrakt z owoców borówki czarnej będzie oferowany w jakości zgodnej z Farmakopeą Europejską, ze standaryzacją na co najmniej 36% antocyjanów. W przyszłości, po zakupieniu odpowiedniej instalacji membranowej o skali produkcyjnej możliwe będzie również oferowanie ekstraktów o wysokich zawartościach antocyjanów w jakości bio. W przypadku jakości bio, separacja z udziałem metod chromatograficznych nie jest akceptowana przez instytucje certyfikujące. Ze względu na czysto fizyczny charakter separacji na membranach instytucje certyfikujące dopuszczają ten rodzaj separacji dla produktów w jakości bio.

### **10.1. Opis opracowanych metod produkcyjnych**

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki badań umożliwiły opracowanie protokołów produkcyjnych.

#### **Protokół ekstrakcji mrożonych owoców lub wyłoków aronii**

Przygotować 1 000 kg mrożonych owoców aronii. Rozdrabniać za pomocą młynka Voran Centrifugal mill RM1,5 (Voran Maschinen GmbH, Pichl bei Wels, Niemcy) ustawionego nad otworem zasypowym ekstraktora. Następnie zalać rozdrobniony surowiec za pomocą 4908 L wody podgrzanej do temperatury 50°C. Dodać 66 kg (92 kg w przypadku wyłoków) 75% kwasu fosforowego spożywczego za pomocą pompy dozującej. Włączyć mieszadło, ogrzać do 45°C. Mieszać zawartość ekstraktora przez 2 godziny w temperaturze 45°C i zdekantować. Zasyp na drugi stopień ekstrakcji stanowi frakcja stała z dekantera z dwóch pierwszych stopni zalana 5000 L wody RO. Czas ekstrakcji 1h w temperaturze 45°C, następnie dekantacja. Filtrować przez materiał filtracyjny na prasie, następnie filtr świecowy o porowatości 20µm.

### **Protokół ekstrakcji mrożonych owoców lub suszonych wyłoków bzu czarnego**

Przygotować 1 000 kg mrożonych owoców bzu czarnego (500 kg w przypadku suszonych wyłoków). Następnie zalać nierozdrobniony surowiec za pomocą 4850 L wody podgrzanej do temperatury 50°C. Dodać 150 kg kwasu cytrynowego spożywczego za pomocą pompy dozującej. Włączyć mieszadło, ogrzać do 45°C. Mieszać zawartość ekstraktora przez 2 godziny w temperaturze 45°C i zdekantować. Zasymp na drugi stopień ekstrakcji stanowi frakcja stała z dekantera z dwóch pierwszych stopni zalana 5000kg wody RO. Czas ekstrakcji 1h w temperaturze 45°C, następnie dekantacja. Filtrować przez materiał filtracyjny na prasie, następnie filtr świecowy o porowatości 20µm.

### **Protokół ekstrakcji mrożonych owoców borówki czarnej**

Przygotować 1 000 kg mrożonych owoców borówki czarnej. Następnie zalać nierozdrobniony surowiec za pomocą 4850 L wody podgrzanej do temperatury 50°C. Dodać 150 kg kwasu cytrynowego spożywczego za pomocą pompy dozującej. Włączyć mieszadło, ogrzać do 45°C. Mieszać zawartość ekstraktora przez 2 godziny w temperaturze 45°C i zdekantować. Zasymp na drugi stopień ekstrakcji stanowi frakcja stała z dekantera z dwóch pierwszych stopni zalana 5000kg wody RO. Czas ekstrakcji 1h w temperaturze 45°C, następnie dekantacja. Filtrować przez materiał filtracyjny na prasie, następnie filtr świecowy o porowatości 20µm.

### **Protokół separacji na kolumnie chromatograficznej ekstraktów z owoców jagodowych**

Ekstrakt po filtracji, podawać na kolumnę w zależności od zawartości antocyjanów w ekstrakcie. Na 100 L żywicy, należy podać ilość ekstraktu zawierającą 1,9 kg antocyjanów, ze średnią prędkością 3BV h<sup>-1</sup> (3300 L h<sup>-1</sup>). Po zakończeniu adsorpcji, podawać na kolumnę 5 BV wody (5500 L), ze średnim przepływem 5 BV h<sup>-1</sup> (5500 L h<sup>-1</sup>). Odciek z kolumny, o absorbancji przekraczającej 0,05, należy zawrócić do zbiornika buforowego. Wypompować wodę z powierzchni żywicy. Podawać na kolumnę 2,5 BV etanolu (2 750 L) o stężeniu 70-65%. Frakcję główną zbierać do zbiornika buforowego w momencie wzrostu absorbancji detektora powyżej 0,05. Frakcję główną zbierać do momentu spadku absorbancji detektora poniżej 0,05.

### **Protokół zagęszczania i suszenia**

Odparowanie należy prowadzić na wyparce próżniowej w temperaturze nie przekraczającej 45 °C, przy ciśnieniu <50 mbar. Zagęszczanie prowadzić do momentu

uzyskania suchej masy, oznaczanej na wagosuszarce, w przedziale 30-35%. Zagęszczony ekstrakt kierować do suszarni rozpyłowej, podając do suszenia około 150-200 L h<sup>-1</sup> ekstraktu. Suszenie prowadzić w temperaturze 165-170 °C na wlocie i 85 °C na wylocie. Gotowy produkt pakować do worków strunowych PET12/AL8/PE80 po 5 lub 10 kg.

## **10.2. Specyfikacje wdrożonych do produkcji ekstraktów**

Na podstawie badań wykonywanych w laboratorium firmy Greenvit sp. z o. o. oraz wymagań przepisów prawa, dotyczących zawartości substancji niepożądanych, powstały specyfikacje wdrożonych produktów. Do zwolnienia każdej partii produktu przez Dział Jakości wymagane jest potwierdzenie spełnienia wszystkich przedstawionych w poniższych specyfikacjach wymagań. Zawartość antocyjanów, zawartość polifenoli, organoleptyka oraz strata masy po suszeniu analizowane są w laboratorium fizyko-chemicznym firmy Greenvit. Zawartość substancji niepożądanych oraz badania mikrobiologiczne są aktualnie zlecane do akredytowanych laboratoriów zewnętrznych. Załącznik numer 1 (strona 138) stanowi specyfikacja produktu, opracowanego w ramach niniejszych badań - suchego ekstraktu z owoców aronii, standaryzowanego na 25% antocyjanów (AronVit™). Załącznikiem numer 2 (strona 143) jest specyfikacja kolejnego produktu, opracowanego w ramach niniejszych badań – suchego ekstraktu z owoców bzu czarnego, standaryzowanego na 25% antocyjanów. Oba produkty zostały włączone do oferty firmy Greenvit Sp. z o. o.

## V. WNIOSKI

Przeprowadzone badania i uzyskane wyniki umożliwiają wyciągnięcie następujących wniosków.

### **W zakresie optymalizacji etapu ekstrakcji.**

Ekstrakcja antocyjanów za pomocą powszechnie stosowanych w badaniach naukowych mieszanin etanolu i wody, nie jest praktyczna w warunkach przemysłowych, ponieważ powoduje problemy technologiczne i podwyższa koszty produkcji. Zastosowanie do ekstrakcji wodnych roztworów siarczynów (IV), mimo wysokiej wydajności ekstrakcji, przyczynia się do podwyższonego poziomu pozostałości siarczanów (IV) w produkcie, nawet mimo zastosowania separacji chromatograficznej. Stwierdzono, że wydajnymi ekstrahentami antocyjanów są wodne roztwory kwasów, dopuszczonych do stosowania w przemyśle spożywczym. Zależnie od aktualnych kosztów, na tym etapie można używać zarówno kwasu cytrynowego jak i fosforowego. Jedynie w przypadku wyłoków z aronii preferowany jest wodny roztwór kwasu fosforowego. W przypadku pozostałych surowców, mimo nieznacznie niższej wydajności ekstrakcji, kwas cytrynowy jest korzystniejszy w skali przemysłowej, z powodu mniejszych problemów na etapie filtracji ekstraktu. Surowcem zastosowanym do ekstrakcji, opracowaną w ramach doktoratu metodą, mogą być zarówno mrożone lub suszone wyłoki jak i mrożone owoce.

Proces ekstrakcji, w przypadku każdego z przebadanych surowców roślinnych, jest możliwy do przeprowadzenia w niskiej temperaturze, wynoszącej 40°C i w stosunkowo krótkim czasie 120 minut. Zastosowanie drugiego stopnia ekstrakcji (ponowne zalewanie surowca ekstrahentem) umożliwiło zwiększenie wydajności ekstrakcji oraz zmniejszenie stosunku ekstrahenta do surowca (E/S). Zastosowanie czystej wody jako ekstrahenta antocyjanów na drugim stopniu ekstrakcji nie powoduje obniżenia wydajności tego procesu i obniża koszty produkcji. Zmniejszenie E/S, do wartości 5:1, umożliwia obniżenie kosztów produkcji i zwiększenie wydajności linii produkcyjnej. Jest to wartość znacznie niższa od wartości tego parametru, wyznaczonej na podstawie opublikowanych badań naukowych, które często sięgają 20-34.

### **W zakresie optymalizacji etapu separacji**

W celu uzyskania najbardziej wydajnej adsorpcji i desorpcji, wytypowano, żywicę Sepabeads SP700 gwarantującą wysoką pojemność i niskie straty antocyjanów. Jest to żywica



zbudowana z kopolimeru styren-DVB. Na tym etapie, z powodu niskiej pojemności i wysokich strat, odrzucono powszechnie stosowaną w badaniach podstawowych żywicę Amberlite XAD-7 HP, która jest polimerem metakrylowym. Wybraną żywicę Sepabeads SP700 zastosowano do zbadania separacji antocyjanów z surowców roślinnych, różniących się zawartością antocyjanów. W przypadku aronii, bzu czarnego i borówki czarnej otrzymano ekstrakty o zawartości przekraczającej 25%. Wszystkie ekstrakty z owoców borówki czarnej, spełniały wymaganą przez Farmakopeę Europejską zawartość 36% antocyjanów. Natomiast ekstrakty z owoców bzu czarnego spełniały kryterium akceptacji według Farmakopei Amerykańskiej – zawierały ponad 17% antocyjanów w suchej masie.

W przypadku technik membranowych najkorzystniejsze wyniki otrzymano dla membrany ultrafiltracyjnej o MWCO wynoszącym 1 kDa. Jest to wartość większa od masy cząsteczkowej antocyjanów z badanych surowców roślinnych (ok. 419-744 Da). Korzystny wpływ na straty antocyjanów w trakcie procesu, wywierał wzrost ciśnienia transmembranowego i obniżenie temperatury w trakcie UF. Zastosowanie UF umożliwiło zwiększenie zawartości antocyjanów w suchym ekstrakcie i obniżenie zawartości cukrów prostych wystarczające do wysuszenia rozpyłowego ekstraktów.

Za pomocą separacji na membranach MF i NF nie uzyskano wydajnej separacji antocyjanów zawartych w ekstraktach. MF może być zastosowana jedynie do wstępnej filtracji, przed zastosowaniem UF, lub przed separacją chromatograficzną, zamiast filtracji na prasie ramowej. Z kolei NF może służyć do zagęszczania ekstraktów lub soków, ponieważ wzrost zawartości antocyjanów w suchej masie nie jest wystarczający do otrzymania ekstraktów spełniających oczekiwania rynku. Dodatkowo, spadek zawartości cukrów prostych, uzyskany z zastosowaniem nanofiltracji nie jest wystarczający również do rozpyłowego wysuszenia ekstraktów.

### **W zakresie analizy chemicznej ekstraktów**

Zidentyfikowano charakterystyczne, dla badanych surowców, substancje, korzystając z metody HPLC w odwróconym układzie faz. Profile chromatograficzne każdego z analizowanych ekstraktów odpowiadały danym literaturowym dla surowców użytych do wytwarzania ekstraktów. Zidentyfikowanie charakterystycznych profili chromatograficznych jest ważnym etapem umożliwiającym potwierdzenie tożsamości badanych surowców roślinnych i ekstraktów. Analiza charakterystycznych profili chromatograficznych umożliwia uniknięcie zafałszowania tańszymi surowcami i potwierdza tożsamość botaniczną ekstraktów.

### **W zakresie badań biologicznych ekstraktów**

Na tym etapie badań, potwierdzono przeciwzapalne i przeciwutleniające właściwości ekstraktu z aronii, na modelu makrofagów RAW264.7. W przypadku ekstraktów z owoców bzu czarnego potwierdzono hamowanie proliferacji wybranych komórek nowotworowych oraz stymulację proliferacji nienowotworowych, jednojądrzastych komórek krwi obwodowej. Korzystny wpływ na proliferację wywierał zarówno ekstrakt po separacji chromatograficznej jak i ekstrakt separowany za pomocą technik membranowych.

### **W zakresie wdrożenia wyników badań**

Na podstawie wyników badań otrzymanych w skali laboratoryjnej opracowano metody produkcji suchych ekstraktów standaryzowanych na co najmniej 25% antocyjanów. Opracowano protokoły ekstrakcji, separacji i suszenia ekstraktów z owoców i wyłoków aronii, bzu czarnego i borówki czarnej. Ekstrakty z aronii i bzu czarnego zostały włączone do oferty firmy a ekstrakt z borówki czarnej zostanie włączony w najbliższej kolejności. Dla ekstraktów włączonych do oferty firmy Greenvit, opracowano specyfikacje, uwzględniające standaryzacje oraz przepisy prawa żywnościowego.

## VI. SPIS TABEL I RYSUNKÓW

### Spis rysunków

Rysunek 1. Struktura antocyjanów. R <sup>3</sup> -R <sup>7</sup> : reszta cukru, -OH, -H lub -OCH <sub>3</sub> . .....	17
Rysunek 2. Zależność struktury antocyjanów od pH na przykładzie 3-O-glukozydu cyjanidyny. ....	18
Rysunek 3. Widmo antocyjanów na przykładzie ekstraktu z owoców bzu czarnego.....	21
Rysunek 4. Ogólny schemat instalacji membranowej w trybie filtracji skrośnej. ....	25
Rysunek 5. Podział ciśnieniowych technik membranowych ze względu na .....	26
Rysunek 6. Rodzaje modułów membranowych: A - Moduł rurowy, B - Moduł kapilarny/z włóknami kanalikowymi, C - Moduł spiralny, D – Moduł płaski. ....	31
Rysunek 7. Schemat suszarni rozpyłowej. Opracowano na podstawie [150]. ....	32
Rysunek 8. Ekstraktory zastosowane do testów w skali produkcyjnej. ....	37
Rysunek 9. Laboratoryjna instalacja stosowana do badania technik membranowych. ....	38
Rysunek 10. Pilotażowa instalacja stosowana do badania technik membranowych. ....	39
Rysunek 11. Membrana ceramiczna (A) i membrana polimerowa, spiralna (B). ....	40
Rysunek 12. Kolumna zastosowana do prac w skali produkcyjnej. ....	41
Rysunek 13. Wpływ stężenia alkoholu etylowego na ekstrakcję antocyjanów z wyłoków z aronii. Ekstrakcję prowadzono przez 120 min., w temperaturze 40°C. ....	50
Rysunek 14. Wpływ stężenia wodorosiarczynu sodu na ekstrakcję antocyjanów z wyłoków z aronii. Ekstrakcję prowadzono przez 120 min., w temperaturze 40°C. ....	52
Rysunek 15. Wpływ stężenia kwasu fosforowego na ekstrakcję antocyjanów z wyłoków z aronii. Ekstrakcję prowadzono przez 120 min., w temperaturze 40°C. ....	53
Rysunek 16. Wpływ czasu ekstrakcji i temperatury na wydajność ekstrakcji antocyjanów z wyłoków aronii za pomocą wodnego roztworu kwasu fosforowego. ....	55
Rysunek 17. Wpływ rodzaju i stężenia kwasu na ekstrakcję antocyjanów z mrożonych owocach aronii. Ekstrakcję prowadzono przez 120 min, w temperaturze 40°C. ....	57
Rysunek 18. Wpływ rodzaju i stężenia kwasu na ekstrakcję antocyjanów z mrożonych owoców bzu czarnego. Ekstrakcję prowadzono przez 120 min., w temperaturze 40°C. ....	59
Rysunek 19. Wpływ czasu i temperatury na ekstrakcję antocyjanów z mrożonych owoców bzu czarnego. Ekstrahent – 3% wodny roztwór kwasu cytrynowego. ....	60
Rysunek 20. Wpływ rodzaju i stężenia kwasu na ekstrakcję antocyjanów z mrożonych owoców borówki czarnej. Czas ekstrakcji wynosił 120 minut, temperatura 40°C. ....	62
Rysunek 21. Zmiany przepływu i absorbancji w trakcie mikrofiltracji na jednokanałowej membranie 0,45µm przy ciśnieniu transmembranowym 5 barów. ....	70
Rysunek 22. Wpływ ciśnienia transmembranowego na zawartość antocyjanów w strumieniu permeatu. Membrana XT MAX 1 kDa, temperatura 25°C. ....	74
Rysunek 23. Wpływ temperatury na zawartość antocyjanów w strumieniu permeatu. ....	75
Rysunek 24. Zależność zawartości antocyjanów od stopnia zateżenia nadawy na membranie .....	77
Rysunek 25. Wpływ suchego ekstraktu z aronii i LPS na sekrecję IL-1β przez komórki RAW264.7. ....	80
Rysunek 26. Wpływ suchego ekstraktu z aronii i LPS na sekrecję TNF-α przez komórki RAW264.7. ....	81

Rysunek 27. Wpływ suchego ekstraktu z aronii na peroksydację lipidów mierzona za pomocą testu MDA. ....	81
Rysunek 28. Przeżywalność komórek w teście MTT: wpływ EDE na ludzkie komórki A-549 (komórki raka płuc). (separacja na membranie UF). Suchy ekstrakt SN1 został wyprodukowany z zastosowaniem separacji na polimerowej membranie UF o MWCO 1 kDa. Ekstrakt SN2 został wyprodukowany z zastosowaniem separacji chromatograficznej.....	83
Rysunek 29. Przeżywalność komórek w teście MTT: wpływ EDE na ludzkie komórki MCF-7 (komórki raka sutka). Suchy ekstrakt SN1 został wyprodukowany z zastosowaniem separacji na polimerowej membranie UF o MWCO 1 kDa. Ekstrakt SN2 został wyprodukowany z zastosowaniem separacji chromatograficznej. ....	84
Rysunek 30. Przeżywalność komórek w teście MTT: wpływ EDE na ludzkie komórki A-2780 (komórki raka jajnika). Suchy ekstrakt SN1 został wyprodukowany z zastosowaniem separacji na polimerowej membranie UF o MWCO 1 kDa. Ekstrakt SN2 został wyprodukowany z zastosowaniem separacji chromatograficznej. ....	86
Rysunek 31. Przeżywalność komórek w teście MTT: wpływ EDE na komórki HTC-116 (komórki raka okrężnicy). Suchy ekstrakt SN1 został wyprodukowany z zastosowaniem separacji na polimerowej membranie UF o MWCO 1 kDa. Ekstrakt SN2 został wyprodukowany z zastosowaniem separacji chromatograficznej. ....	88
Rysunek 32. Przeżywalność komórek w teście MTT: wpływ EDE na komórki PBMC (jednojądrzaste komórki krwi obwodowej). Suchy ekstrakt SN1 został wyprodukowany z zastosowaniem separacji na polimerowej membranie UF o MWCO 1 kDa. Ekstrakt SN2 został wyprodukowany z zastosowaniem separacji chromatograficznej. ....	90
Rysunek 33. Profil suchego ekstraktu aronii, rozdzielonego za pomocą HPLC. Chromatogram zarejestrowano przy A 520 i B 330 nm.....	96
Rysunek 34. Profil suchego ekstraktu owoców bzu czarnego, rozdzielonego za pomocą HPLC. Chromatogram zarejestrowano przy A 520 i B 353 nm. ....	98
Rysunek 35. Profil suchego ekstraktu z owoców borówki czarnej rozdzielonego za pomocą HPLC. Chromatogram zarejestrowano przy 535 nm. ....	100

## Spis tabel

Tabela 1. Wpływ zakwaszenia na ekstrakcję antocyjanów za pomocą roztworu alkoholu etylowego. ....	51
Tabela 2. Wpływ stosunku ekstrahenta do surowca i drugiego stopnia na ekstrakcję antocyjanów z wycieków aronii. ....	54
Tabela 3. Wpływ drugiego stopnia na ekstrakcję antocyjanów z owoców aronii. ....	58
Tabela 4. Wyniki ekstrakcji antocyjanów z suszonych wycieków z owoców bzu czarnego. ...	61
Tabela 5. Wyniki dwustopniowej ekstrakcji antocyjanów z owoców borówki czarnej. ....	63
Tabela 6. Separacja chromatograficzna ekstraktu z mrożonych wycieków aronii na różnych żywicach adsorpcyjnych. ....	64
Tabela 7. Separacja chromatograficzna ekstraktu z owoców bzu czarnego na różnych żywicach adsorpcyjnych. ....	65
Tabela 8. Wyniki separacji ekstraktów z aronii na kolumnie wypełnionej złożem Sepabeads SP700. ....	66

Tabela 9. Wyniki separacji ekstraktów z owoców bzu czarnego na kolumnie wypełnionej złożem Sepabeads SP700. ....	67
Tabela 10. Wyniki separacji ekstraktów z borówki czarnej na kolumnie wypełnionej złożem Sepabeads SP700.....	68
Tabela 11. Wyniki ultrafiltracji na membranach o wybranych MWCO. Proces prowadzono przy ciśnieniu transmembranowym $5 \pm 0,2$ bar, w temperaturze $30 \pm 2^\circ\text{C}$ . Natężenie przepływu nadawy dla membran polimerowych wynosiło $1200 \pm 50$ L h <sup>-1</sup> , dla membran ceramicznych $110 \pm 10$ L h <sup>-1</sup> .....	72
Tabela 12. Wpływ diafiltracji na zawartość antocyjanów, suchą masę, pH oraz przewodność retentatu.....	76
Tabela 13. Wyniki nanofiltracji. Proces prowadzono przy ciśnieniu transmembranowym = $5 \pm 0,3$ bar (membrana ceramiczna) i $15 \pm 1$ bar (membrana polimerowa), w temperaturze $30 \pm 2^\circ\text{C}$ .....	78
Tabela 14. Wyniki testu MTT dla suchego ekstraktu z aronii. ....	79
Tabela 15. Zawartość wybranych składników ekstraktów z bzu czarnego, wykorzystanych do badań na komórkach hodowlanych. ....	82
Tabela 16. Wartości IC <sub>50</sub> dla ekstraktów z owoców bzu czarnego i badanych linii komórkowych. Znak – oznacza brak możliwości obliczenia IC <sub>50</sub> . ....	85
Tabela 17. Wydajność prób produkcyjnych. S1-S5 – partie produkcyjne suchego ekstraktu z bzu czarnego; A1-A4 - partie produkcyjne suchego ekstraktu z aronii; V1-V5 - partie produkcyjne suchego ekstraktu z borówki czarnej. ....	93
Tabela 18. Zawartość antocyjanów i polifenoli w partiach produkcyjnych suchego ekstraktu z aronii. Suche ekstrakty B1 i B2 oczyszczano na kolumnie o objętości 20 L. Suche ekstrakty A1-A7 oczyszczano na kolumnie o objętości 1100 L. Numery partii A1-A4 odpowiadają numerom A1-A4 z Tabeli 14. ....	95
Tabela 19. Zawartość antocyjanów i polifenoli w partiach produkcyjnych suchego ekstraktu z owoców bzu czarnego. S1-S5 – partie produkcyjne suchego ekstraktu z bzu czarnego. ....	97
Tabela. 20. Zawartość antocyjanów w partiach produkcyjnych suchego ekstraktu z borówki czarnej. B1-B5 – partie produkcyjne suchego ekstraktu z borówki czarnej. ....	99

## VII. BIBLIOGRAFIA

1. Ochmian I, Grajkowski J, Smolik M. Comparison of some morphological features, quality and chemical content of four cultivars of chokeberry fruits (*Aronia melanocarpa*). *Not Bot Horti Agrobot Cluj-Napoca*. 2012;40(1):253–60.  
doi.org/10.15835/nbha4017181
2. Andrzejewska J, Sadowska K, Klóska Ł, Rogowski L. The effect of plant age and harvest time on the content of chosen components and antioxidative potential of black chokeberry fruit. *Acta Sci Pol Cultus*. 2015;14(4):105–14.
3. Kokotkiewicz A, Jaremicz Z, Luczkiewicz M. *Aronia* Plants: A Review of Traditional Use, Biological Activities, and Perspectives for Modern Medicine. *J Med Food*. 2010;13(2):255–69. doi.org/10.1089/jmf.2009.0062
4. Tolić MT, Krbavčić IP, Vujević P, Milinović B, Jurčević IL, Vahčić N. Effects of Weather Conditions on Phenolic Content and Antioxidant Capacity in Juice of Chokeberries (*Aronia melanocarpa* L.). *Polish J Food Nutr Sci*. 2017;67(1):67–74. doi.org/10.1515/pjfn-2016-0009
5. Skrede G, Martinsen BK, Wold AB, Birkeland SE, Aaby K. Variation in quality parameters between and within 14 Nordic tree fruit and berry species. *Acta Agric Scand Sect B Soil Plant Sci*. 2012;62(3):193–208. doi.org/10.1080/09064710.2011.598543
6. Veberic R, Slatnar A, Bizjak J, Stampar F, Mikulic-Petkovsek M. Anthocyanin composition of different wild and cultivated berry species. *Lwt*. 2015;60(1):509–17. doi.org/10.1016/j.lwt.2014.08.033
7. Sidor A, Drożdżyńska A, Gramza-Michałowska A. Black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) and its products as potential health-promoting factors - An overview. *Trends Food Sci Technol*. 2019;89(March 2018):45–60. doi.org/10.1016/j.tifs.2019.05.006
8. Wu X, Gu L, Prior RL, McKay S. Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of *Ribes*, *Aronia*, and *Sambucus* and their antioxidant capacity. *J Agric Food Chem*. 2004;52:7846–56. doi.org/10.1021/jf0486850
9. Meng L, Zhu J, Ma Y, Sun X, Li D, Li L, et al. Composition and antioxidant activity of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* cultivated in Haicheng, Liaoning, China. *Food Biosci*. 2019;30(April 2018). doi.org/10.1016/j.fbio.2019.100413
10. Wangensteen H, Bräunlich M, Nikolic V, Malterud KE, Sliemstad R, Barsett H. Anthocyanins, proanthocyanidins and total phenolics in four cultivars of aronia:

- Antioxidant and enzyme inhibitory effects. *J Funct Foods*. 2014;7(1):746–52. doi.org/10.1016/j.jff.2014.02.006
11. Jakobek L, Drenjančević M, Jukić V, Šeruga M. Phenolic acids, flavonols, anthocyanins and antiradical activity of “Nero”, “Viking”, “Galicianka” and wild chokeberries. *Sci Hort* (Amsterdam). 2012;147(November):56–63. doi.org/10.1016/j.scienta.2012.09.006
  12. Sójka M, Kołodziejczyk K, Milala J. Polyphenolic and basic chemical composition of black chokeberry industrial by-products. *Ind Crops Prod*. 2013;51:77–86. doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.08.051
  13. Slimestad R, Torskangerpoll K, Nateland HS, Johannessen T, Giske NH. Flavonoids from black chokeberries, *Aronia melanocarpa*. *J Food Compos Anal*. 2005;18(1):61–8. doi.org/10.1016/j.jfca.2003.12.003
  14. Wilkes K, Howard LR, Brownmiller C, Prior RL. Changes in Chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) polyphenols during juice processing and storage. *J Agric Food Chem*. 2014;62(18):4018–25. doi.org/10.1021/jf404281n
  15. Kulling SE, Rawel HM. Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) - A review on the characteristic components and potential health effects. *Planta Med*. 2008;74(13):1625–34. doi.org/10.1055/s-0028-1088306
  16. Kokotkiewicz A, Jaremicz Z, Luczkiewicz M. *Aronia* plants: a review of traditional use, biological activities, and perspectives for modern medicine. *J Med Food*. 2010;13(2):255–69. doi.org/10.1089/jmf.2009.0062
  17. Lee KP, Choi NH, Kim HS, Ahn S, Park IS, Lee DW. Anti-neuroinflammatory effects of ethanolic extract of black chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) in lipopolysaccharide-stimulated BV2 cells and ICR mice. *Nutr Res Pract*. 2018;12(1):13–9. doi.org/10.4162/nrp.2018.12.1.13
  18. Park S, Kim J Il, Lee I, Lee S, Hwang MW, Bae JY, et al. *Aronia melanocarpa* and its components demonstrate antiviral activity against influenza viruses. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;440(1):14–9. doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.08.090
  19. Dąbrowski A, Onopiuk BM, Car H, Onopiuk P, Dąbrowska ZN, Rogalska J, et al. Beneficial impact of an extract from the berries of *Aronia melanocarpa* L. On the oxidative-reductive status of the submandibular gland of rats exposed to cadmium. *Antioxidants*. 2020;9:185–204. doi.org/10.3390/antiox9020185
  20. Jurikova T, Mlcek J, Skrovankova S, Sumczynski D, Sochor J, Hlavacova I, et al. Fruits of black chokeberry *aronia melanocarpa* in the prevention of chronic diseases.

- Molecules. 2017;22(6):1–23. doi.org/10.3390/molecules22060944
21. Naruszewicz M, Łaniewska I, Millo B, Dłużniewski M. Combination therapy of statin with flavonoids rich extract from chokeberry fruits enhanced reduction in cardiovascular risk markers in patients after myocardial infraction (MI). *Atherosclerosis*. 2007;194(2):179–84. doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2006.12.032
  22. Bell DR, Gochenaur K, Wallace TC, Rowbotham J, Clayton P, Charron CS, et al. Direct vasoactive and vasoprotective properties of anthocyanin-rich extracts. 2006;100:1164–70. doi.org/10.1152/jappphysiol.00626.2005
  23. Petrovic S, Arsic A, Glibetic M, Cikiriz N, Jakovljevic V, Vucic V. The effects of polyphenol-rich chokeberry juice on fatty acid profiles and lipid peroxidation of active handball players: Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Can J Physiol Pharmacol*. 2016;94(10):1058–63. doi.org/ 10.1139/cjpp-2015-0575
  24. Denev PN, Kratchanov CG, Ciz M, Lojek A, Kratchanova MG. Bioavailability and Antioxidant Activity of Black Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) Polyphenols: In vitro and in vivo Evidences and Possible Mechanisms of Action: A Review. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2012;11(5):471–89. doi.org/10.1111/j.1541-4337.2012.00198.x
  25. Simeonov SB, Botushanov NP, Karahanian EB, Pavlova MB, Husianitis HK TD. Effects of *Aronia melanocarpa* juice as part of the dietary regimen in patients with diabetes mellitus. *Folia Med (Plovdiv)*. 2002;44:20–3.
  26. Bizera M, Giura S. Study on the influence of climate conditions on some black elderberry selections characters. 2019;8(15):196–202.
  27. Schmitzer V, Veberic R, Stampar F. European elderberry (*Sambucus Nigra* L.) and American Elderberry (*Sambucus Canadensis* L.): Botanical, chemical and health properties of flowers, berries and their products. In: *Berries: Properties, Consumption and Nutrition*. 2012. p. 127–48.
  28. Veberic R, Jakopic J, Stampar F, Schmitzer V. European elderberry (*Sambucus nigra* L.) rich in sugars, organic acids, anthocyanins and selected polyphenols. *Food Chem*. 2009;114:511–5. /10.1016/j.foodchem.2008.09.080
  29. Csorba V, Tóth M, László AM, Kardos L, Kovács S. Cultivar and year effects on the chemical composition of elderberry (*Sambucus nigra* L.) fruits. *Not Bot Horti Agrobot Cluj Napoca*. 2020;48:770–82.
  30. United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 41-NF 36) United States Pharmacopeial Convention; 2016. Accessed March 1, 2019. In 2016.
  31. Kiproviski B, Malenčić Đ, Ljubojević M, Ognjanov V, Veberic R, Hudina M, et al.



- Quality parameters change during ripening in leaves and fruits of wild growing and cultivated elderberry (*Sambucus nigra*) genotypes. *Sci Hortic.* 2021;277; 109792. doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109792
32. Senica M, Stampar F, Mikulic-Petkovsek M. Harmful (cyanogenic glycoside) and beneficial (phenolic) compounds in different *Sambucus* species. *J Berry Res.* 2019;9(3):395–409. doi.org/ 10.3233/JBR-180369
  33. Senica M, Stampar F, Veberic R, Mikulic-Petkovsek M. The higher the better? Differences in phenolics and cyanogenic glycosides in *Sambucus nigra* leaves, flowers and berries from different altitudes. *J Sci Food Agric.* 2017;97(8):2623–32. doi.org/ 10.1002/jsfa.8085
  34. Gafner BS, Borchardt T, Bush M, Sudberg S, Tenon YR, Jolibois JH, et al. Tales from the Elder : Adulteration Issues of Elder Berry. *HerbalEGram.* 2021;130:24–32.
  35. Zakay-Rones Z, Varsano N, Zlotnik M, Manor O, Regev L, Schlesinger M, et al. Inhibition of Several Strains of Influenza Virus in Vitro and Reduction of Symptoms by an Elderberry Extract (*Sambucus nigra* L.) during an Outbreak of Influenza B Panama. *J Altern Complement Med.* 1995;1:361–9. doi.org/10.1089/acm.1995.1.361
  36. Zakay-Rones Z, Thom E, Wollan T, Wadstein J. Randomized study of the efficacy and safety of oral elderberry extract in the treatment of influenza A and B virus infections. *J Int Med Res.* 2004;32(2):132–40.
  37. Torabian G, Valtchev P, Adil Q, Dehghani F. Anti-influenza activity of elderberry (*Sambucus nigra*). *J Funct Foods.* 2019;54:353–60. doi.org/10.1016/j.jff.2019.01.031
  38. Boroduske A, Jekabsons K, Riekstina U, Muceniece R, Rostoks N, Nakurte I. Wild *Sambucus nigra* L. from north-east edge of the species range: A valuable germplasm with inhibitory capacity against SARS-CoV2 S-protein RBD and hACE2 binding in vitro. *Ind Crops Prod.* 2021;165(December 2020):113438. doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113438
  39. Youdim KA, Martin A, Joseph JA. Incorporation of the elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2000;29(1):51–60.
  40. Ho GTT, Kase ET, Wangenstein H, Barsett H. Phenolic Elderberry Extracts, Anthocyanins, Procyanidins, and Metabolites Influence Glucose and Fatty Acid Uptake in Human Skeletal Muscle Cells. *J Agric Food Chem.* 2017;65:2677–85.
  41. Nestby R, Percival D, Martinussen I, Opstad N, Rohloff J. The European Blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and the Potential for Cultivation. A Review. 2011;1–3.

42. Nin S, Petrucci WA, Del Bubba M, Ancillotti C, Giordani E. Effects of environmental factors on seed germination and seedling establishment in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). *Sci Hortic (Amsterdam)*. 2017;226(August):241–9. /10.1016/j.scienta.2017.08.049
43. Ritchie JC. *Vaccinium myrtillus*. *J Ecol*. 1956;291–9.
44. Primetta AK, Jaakola L, Ayaz FA, Inceer H, Riihinen KR. Anthocyanin fingerprinting for authenticity studies of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). *Food Control*. 2013;30(2):662–7.
45. Pires TCSP, Caleja C, Santos-Buelga C, Barros L, Ferreira ICFR. *Vaccinium myrtillus* L. Fruits as a Novel Source of Phenolic Compounds with Health Benefits and Industrial Applications - A Review. *Curr Pharm Des*. 2020;26(16):1917–28.
46. Lähti AK, Riihinen KR, Kainulainen PS. Analysis of anthocyanin variation in wild populations of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) in Finland. *J Agric Food Chem*. 2008;56(1):190–6.
47. Tumbas Šaponjac V, Čanadanović-Brunet J, Četković G, Djilas S, Četojević-Simin D. Dried bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extract fractions as antioxidants and cancer cell growth inhibitors. *Lwt*. 2015;61(2):615–21.
48. González-Paramás AM, Brighenti V, Bertoni L, Marcelloni L, Ayuda-Durán B, González-Manzano S, et al. Assessment of the in vivo antioxidant activity of an anthocyanin-rich bilberry extract using the *Caenorhabditis elegans* model. *Antioxidants*. 2020;9(6):1–16.
49. Valentová K, Ulrichová J, Cvak L, Šimánek V. Cytoprotective effect of a bilberry extract against oxidative damage of rat hepatocytes. *Food Chem*. 2006;101(3):912–7. doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.038
50. Cásedas G, González-Burgos E, Smith C, López V, Gómez-Serranillos MP. Regulation of redox status in neuronal SH-SY5Y cells by blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) juice, cranberry (*Vaccinium macrocarpon* A.) juice and cyanidin. *Food Chem Toxicol*. 2018;118:572–80. doi.org/10.1016/j.fct.2018.05.066
51. Calò R, Marabini L. Protective effect of *Vaccinium myrtillus* extract against UVA- and UVB-induced damage in a human keratinocyte cell line (HaCaT cells). *J Photochem Photobiol B Biol*. 2014;132:27–35.
52. Arevström L, Bergh C, Landberg R, Wu H, Rodriguez-Mateos A, Waldenborg M, et al. Freeze-dried bilberry (*Vaccinium myrtillus*) dietary supplement improves walking distance and lipids after myocardial infarction: an open-label randomized clinical trial. *Nutr Res*. 2019;62:13–22. doi.org/10.1016/j.nutres.2018.11.008

53. Kosehira M, Machida N, Kitaichi N. A 12-week-long intake of bilberry extract (*Vaccinium myrtillus* L.) improved objective findings of ciliary muscle contraction of the eye: A randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group comparison trial. *Nutrients*. 2020;12(3).
54. Kamiya K, Kobashi H, Fujiwara K, Ando W, Shimizu K. Effect of fermented bilberry extracts on visual outcomes in eyes with myopia: A prospective, randomized, placebo-controlled study. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2013;29(3):356–9.
55. Omar I. Effect of bilberry extract on slowing high-myopia progression in children: 2-year follow-up study. *Clin Ophthalmol*. 2018;12:2575–9.
56. Riva A, Togni S, Franceschi F, Kawada S, Inaba Y, Eggenhoffner R. The effect of a natural, standardized bilberry extract (Mirtoselect®) in dry eye. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017;2518–25.
57. Mattioli R, Francioso A, Mosca L, Silva P. Anthocyanins: A Comprehensive Review of Their Chemical Properties and Health Effects on Cardiovascular and Neurodegenerative Diseases. *Molecules*. 2020;25(17).
58. Castañeda-Ovando A, Pacheco-Hernández M de L, Páez-Hernández ME, Rodríguez JA, Galán-Vidal CA. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chem*. 2009;113(4):859–71. /10.1016/j.foodchem.2008.09.001
59. Montilla EC, Arzaba MR, Hillebrand S, Winterhalter P. Anthocyanin composition of black carrot (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) Cultivars antonina, beta sweet, deep purple, and purple haze. *J Agric Food Chem*. 2011;59:3385–90.
60. Trouillas P, Sancho-García JC, De Freitas V, Gierschner J, Otyepka M, Dangles O. Stabilizing and Modulating Color by Copigmentation: Insights from Theory and Experiment. *Chem Rev*. 2016;116(9):4937–82.
61. Rakić V, Poklar Ulrih N. Influence of pH on color variation and stability of cyanidin and cyanidin 3-O- $\beta$ -glucopyranoside in aqueous solution. *CYTA - J Food*. 2021;19:174–82. doi.org/10.1080/19476337.2021.1874539
62. Lee J, Durst RW, Wrolstad RE. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. *J AOAC Int*. 2005;88:1269–78.
63. Zhang KM, Yu HJ, Shi K, Zhou YH, Yu JQ, Xia XJ. Photoprotective roles of anthocyanins in *Begonia semperflorens*. *Plant Sci*. 2010;179(3):202–8. /10.1016/j.plantsci.2010.05.006
64. Costa D, Galvão AM, Di Paolo RE, Freitas AA, Lima JC, Quina FH, et al.

- Photochemistry of the hemiketal form of anthocyanins and its potential role in plant protection from UV-B radiation. *Tetrahedron*. 2015;71(20):3157–62.
65. Zheng XT, Yu ZC, Tang JW, Cai ML, Chen YL, Yang CW, et al. The major photoprotective role of anthocyanins in leaves of *Arabidopsis thaliana* under long-term high light treatment: antioxidant or light attenuator? *Photosynth Res*. 2021;149(1–2):25–40. doi.org/10.1007/s11120-020-00761-8
  66. Karageorgou P, Manetas Y. The importance of being red when young: Anthocyanins and the protection of young leaves of *Quercus coccifera* from insect herbivory and excess light. *Tree Physiol*. 2006;26(5):613–21.
  67. Silva S, Costa EM, Calhau C, Morais RM, Pintado ME. Anthocyanin extraction from plant tissues: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2017;57:3072–83.
  68. Wathon MH, Beaumont N, Benohoud M, Blackburn RS, Rayner CM. Extraction of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* skin waste as a sustainable source of natural colorants. *Color Technol*. 2019;135(1):5–16.
  69. Domínguez R, Zhang L, Rocchetti G, Lucini L, Pateiro M, Munekata PES, et al. Elderberry (*Sambucus nigra* L.) as potential source of antioxidants. Characterization, optimization of extraction parameters and bioactive properties. *Food Chem*. 2020;330(May):127266. doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127266
  70. Cacace JE, Mazza G. Extraction of anthocyanins and other phenolics from black currants with sulfured water. *J Agric Food Chem*. 2002;50:5939–46.
  71. Gao L, Mazza G. Extraction of anthocyanin pigments from purple sunflower hulls. *J Food Sci*. 1996;61(3):600–3.
  72. Oliphant T, Mitra A, Wilkinson M. Contact allergy to sodium sulfite and its relationship to sodium metabisulfite. *Contact Dermatitis*. 2012;66(3):128–30.
  73. Türker N, Erdog̃du F. Effects of pH and temperature of extraction medium on effective diffusion coefficient of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* var. L.). *J Food Eng*. 2006;76(4):579–83.
  74. Bonfigli M, Godoy E, Reinheimer MA, Scenna NJ. Comparison between conventional and ultrasound-assisted techniques for extraction of anthocyanins from grape pomace. Experimental results and mathematical modeling. *J Food Eng*. 2017;207:56–72.
  75. Zheng X, Xu X, Liu C, Sun Y, Lin Z, Liu H. Extraction characteristics and optimal parameters of anthocyanin from blueberry powder under microwave-assisted extraction conditions. *Sep Purif Technol*. 2013;104:17–25. /10.1016/j.seppur.2012.11.011
  76. Rajha HN, Darra N El, Hobaika Z, Boussetta N, Vorobiev E, Maroun RG, et al.

- Extraction of Total Phenolic Compounds, Flavonoids, Anthocyanins and Tannins from Grape Byproducts by Response Surface Methodology. Influence of Solid-Liquid Ratio, Particle Size, Time, Temperature and Solvent Mixtures on the Optimization Process. *Food Nutr Sci*. 2014;5(4):397–409.
77. Koponen JM, Buchert J, Poutanen KS, Törrönen AR. Effect of pectinolytic juice production on the extractability and fate of bilberry and black currant anthocyanins. *Eur Food Res Technol*. 2008;227(2):485–94.
  78. Xu Q, Zhou Y, Wu Y, Jia Q, Gao G, Nie F. Enzyme-assisted solvent extraction for extraction of blueberry anthocyanins and separation using resin adsorption combined with extraction technologies. *Int J Food Sci Technol*. 2016;51(12):2567–73.
  79. Maier T, Göppert A, Kammerer DR, Schieber A, Carle R. Optimization of a process for enzyme-assisted pigment extraction from grape (*Vitis vinifera* L.) pomace. *Eur Food Res Technol*. 2008;227(1):267–75.
  80. Buchert J, Koponen JM, Suutarinen M, Mustranta A, Lille M, Törrönen R, et al. Effect of enzyme-aided pressing on anthocyanin yield and profiles in bilberry and blackcurrant juices. *J Sci Food Agric*. 2005;85(15):2548–56.
  81. Siddiq M, Dolan KD, Perkins-Veazie P, Collins JK. Effect of pectinolytic and cellulolytic enzymes on the physical, chemical, and antioxidant properties of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) juice. *LWT - Food Sci Technol*. 2018;92(January):127–32. doi.org/10.1016/j.lwt.2018.02.008
  82. Ishii S, Yokotsuka T. Clarification of Fruit Juice by Pectin fraws-Eliminase. *J Agric Food Chem*. 1972;20(4):787–91.
  83. Mónica Giusti M, Wrolstad RE. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-visible Spectroscopy. In: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. 2001. p. F1.2.1-F1.2.13.  
currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/0471142913.faf0102s00
  84. Lee J, Rennaker C, Wrolstad RE. Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chem*. 2008;110(3):782–6.
  85. Chandra Singh M, Kelso C, Price WE, Probst Y. Validated liquid chromatography separation methods for identification and quantification of anthocyanins in fruit and vegetables: A systematic review. *Food Res Int*. 2020;138:109754. doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109754
  86. Tomaz I, Maslov L. Simultaneous determination of phenolic compounds in different matrices using phenyl-hexyl stationary phase. *Food Anal Methods*. 2016;9(2):401–10.

87. Deineka VI, Saenko II, Deineka LA, Blinova IP. Hydrophilic interaction chromatography as an alternative to reversed-phase HPLC in determining anthocyanins and betacyanins. *J Anal Chem.* 2016;71(3):297–301.
88. Wu X, Prior RL. Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: Fruits and berries. *J Agric Food Chem.* 2005;53(7):2589–99.
89. Lee SG, Vance TM, Nam TG, Kim DO, Koo SI, Chun OK. Evaluation of pH differential and HPLC methods expressed as cyanidin-3-glucoside equivalent for measuring the total anthocyanin contents of berries. *J Food Meas Charact.* 2016;10(3):562–8.
90. Garzón GA, Narváez CE, Riedl KM, Schwartz SJ. Chemical composition, anthocyanins, non-anthocyanin phenolics and antioxidant activity of wild bilberry (*Vaccinium meridionale Swartz*) from Colombia. *Food Chem.* 2010;122(4):980–6. /10.1016/j.foodchem.2010.03.017
91. Ruiz A, Hermosín-Gutiérrez I, Vergara C, von Baer D, Zapata M, Hitschfeld A, et al. Anthocyanin profiles in south Patagonian wild berries by HPLC-DAD-ESI-MS/MS. *Food Res Int.* 2013;51(2):706–13. /10.1016/j.foodres.2013.01.043
92. Kraemer-Schafhalter A, Fuchs H, Pfannhauser W. Solid-phase extraction (SPE) - A comparison of 16 materials for the purification of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* var Nero. *J Sci Food Agric.* 1998;78(3):435–40.
93. Lee JKM, Taip FS, Abdullah HZ. Effectiveness of additives in spray drying performance: a review. *Food Res.* 2018;2:486–99.
94. Bednarska MA, Janiszewska-Turak E. The influence of spray drying parameters and carrier material on the physico-chemical properties and quality of chokeberry juice powder. *J Food Sci Technol.* 2020;57(2):564–77. doi.org/10.1007/s13197-019-04088-8
95. Sandhu AK, Gu L. Adsorption/desorption characteristics and separation of anthocyanins from muscadine (*Vitis rotundifolia*) juice pomace by use of macroporous adsorbent resins. *J Agric Food Chem.* 2013;61(7):1441–8.
96. Vieira GS, Moreira FKV, Matsumoto RLS, Michelon M, Filho FM, Hubinger MD. Influence of nanofiltration membrane features on enrichment of jussara ethanolic extract (*Euterpe edulis*) in anthocyanins. *J Food Eng.* 2018;226:31–41.
97. Cissé M, Vaillant F, Pallet D, Dornier M. Selecting ultrafiltration and nanofiltration membranes to concentrate anthocyanins from roselle extract (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Food Res Int.* 2011;44(9):2607–14. /10.1016/j.foodres.2011.04.046
98. Martín J, Díaz-Montaña EJ, Asuero AG. Recovery of Anthocyanins Using Membrane

- Technologies: A Review. *Crit Rev Anal Chem.* 2018;48(3):143–75.
99. Handa SS, Khanuja SPS, Longo G, Rakesh DD, editors. *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants.* 2008.
  100. Weber P, Hamburger M, Schafroth N, Potterat O. Flash chromatography on cartridges for the separation of plant extracts: Rules for the selection of chromatographic conditions and comparison with medium pressure liquid chromatography. *Fitoterapia.* 2011;82(2):155–61. /10.1016/j.fitote.2010.08.013
  101. Kammerer J, Carle R, Kammerer DR. Adsorption and ion exchange: Basic principles and their application in food processing. *J Agric Food Chem.* 2011;59(1):22–42.
  102. Kou P, Kang YF, Wang LT, Niu LJ, Xiao Y, Guo N, et al. An integrated strategy for production of four anthocyanin compounds from *Ribes nigrum* L. by deep eutectic solvents and flash chromatography. *J Ind Eng Chem.* 2019;80:614–25. doi.org/10.1016/j.jiec.2019.08.053
  103. Di Mauro A, Arena E, Fallico B, Passerini A, Maccarone E. Recovery of anthocyanins from pulp wash of pigmented oranges by concentration on resins. *J Agric Food Chem.* 2002;50(21):5968–74.
  104. Yamamoto S, Hakoda M, Oda T, Hosono M. Rational method for designing efficient separations by chromatography on polystyrene-divinylbenzene resins eluted with aqueous ethanol. *J Chromatogr A.* 2007;1162(1 SPEC. ISS.):50–5.
  105. RELITE - DIAION - SEPABEADS-ReliSorb Adsorbent resins: Industrial column loading and pre-conditioning. Resindion S r.l. 2008;
  106. Ottens M, Chilamkurthi S. Advances in process chromatography and applications in the food, beverage and nutraceutical industries. In: *Separation, Extraction and Concentration Processes in the Food, Beverage and Nutraceutical Industries.* Woodhead Publishing Limited; 2010. p. 109–47. /10.1533/9780857090751.1.109
  107. Yue D, Yang L, Liu S, Li J, Li W, Ma C. A continuous procedure based on column chromatography to purify anthocyanins from *Schisandra chinensis* by a macroporous resin plus gel filtration chromatography. *Molecules.* 2016;21(2):1–14.
  108. Xue H, Shen L, Wang X, Liu C, Liu C, Liu H, et al. Isolation and purification of anthocyanin from blueberry using macroporous resin combined sephadex LH-20 techniques. *Food Sci Technol Res.* 2019;25(1):29–38.
  109. Lin L, Zhao H, Dong Y, Yang B, Zhao M. Macroporous resin purification behavior of phenolics and rosmarinic acid from *Rabdosia serra* (MAXIM.) HARA leaf. *Food Chem.* 2012;130(2):417–24. /10.1016/j.foodchem.2011.07.069

110. Cheng S, Tang H, Yan H. Effects of multiple weak interactions on the binding of phenolic compounds by polymeric adsorbents. *J Appl Polym Sci.* 2006;102(5):4652–8.
111. Pan B, Zhang H. A modified polanyi-based model for mechanistic understanding of adsorption of phenolic compounds onto polymeric adsorbents. *Environ Sci Technol.* 2012;46(12):6806–14.
112. Trikas ED, Papi RM, Kyriakidis DA, Zachariadis GA. Evaluation of ion exchange and sorbing materials for their adsorption/desorption performance towards anthocyanins, total phenolics, and sugars from a grape pomace extract. *Separations.* 2017;4(1).
113. Pettersson SW, Collet E, Andersson U. Chemical stability of reversed phase high performance liquid chromatography silica under sodium hydroxide regeneration conditions. *J Chromatogr A.* 2007;1142(1 SPEC. ISS.):93–7.
114. Witrowa-Rajchert D. Procesy membranowe w technologii żywności. *Przem spożywczy.* 2001;8:52–5.
115. Kirschner AY, Cheng YH, Paul DR, Field RW, Freeman BD. Fouling mechanisms in constant flux crossflow ultrafiltration. *J Memb Sci.* 2019;574(November 2018):65–75. doi.org/10.1016/j.memsci.2018.12.001
116. Cheryan M. *Ultrafiltration and microfiltration handbook.* CRC Press; 1998.
117. Regiec P. Zastosowanie technik membranowych do pozyskiwania niskocząsteczkowych protein białka jaja kurzego. *Żywność Nauk Technol Jakość.* 2004;2 supl.:121–33.
118. Fernández García L, Álvarez Blanco S, Riera Rodríguez FA. Microfiltration applied to dairy streams: Removal of bacteria. *J Sci Food Agric.* 2013;93(2):187–96.
119. Urošević T, Povrenović D, Vukosavljević P, Urošević I, Stevanović S. Recent developments in microfiltration and ultrafiltration of fruit juices. *Food Bioprod Process.* 2017;106:147–61. /10.1016/j.fbp.2017.09.009
120. Zolfaghari G, Kargar M. Nanofiltration and microfiltration for the removal of chromium, total dissolved solids, and sulfate from water. *MethodsX.* 2019;6(January):549–57.
121. Tamires Vitor Pereira D, Vollet Marson G, Fernández Barbero G, Gadioli Tarone A, Baú Betim Cazarin C, Dupas Hubinger M, et al. Concentration of bioactive compounds from grape marc using pressurized liquid extraction followed by integrated membrane processes. *Sep Purif Technol.* 2020;250(June):117206. doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117206
122. Chen Y, Yu LJ, Rupasinghe HV. Effect of thermal and non-thermal pasteurisation on the microbial inactivation and phenolic degradation in fruit juice: A mini-review. *J Sci Food Agric.* 2013;93(5):981–6.



123. Lachowicz S, Oszmiański J, Kolniak-Ostek J, Stokłosa D. Effect of different sizes of ceramic membranes in the process of microfiltration on physicochemical parameters of chokeberry juice. *Eur Food Res Technol.* 2019;245(6):1263–75. /10.1007/s00217-019-03246-8
124. Yu X, Leconte N, Méjean S, Garric G, Even S, Henry G, et al. Semi-industrial production of a minimally processed infant formula powder using membrane filtration. *J Dairy Sci.* 2021;104(5):5265–78.
125. Rautenbach R, Vossenkaul K, Linn T, Katz T. Waste water treatment by membrane processes - New development in ultrafiltration, nanofiltration and reverse osmosis. *Desalination.* 1996;108:247–53.
126. Van Der Bruggen B, Vandecasteele C, Van Gestel T, Doyen W, Leysen R. A review of pressure-driven membrane processes in wastewater treatment and drinking water production. *Environ Prog.* 2003;22(1):46–56.
127. Cassano A, Conidi C, Ruby-Figueroa R, Castro-Muñoz R. Nanofiltration and tight ultrafiltration membranes for the recovery of polyphenols from agro-food by-products. *Int J Mol Sci.* 2018;19:351–72.
128. Gao W, Liang H, Ma J, Han M, Chen Z lin, Han Z shuang, et al. Membrane fouling control in ultrafiltration technology for drinking water production: A review. *Desalination.* 2011;272(1–3):1–8. /10.1016/j.desal.2011.01.051
129. Baldasso C, Barros TC, Tessaro IC. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. *Desalination.* 2011;278(1–3):381–6.
130. Almécija MC, Ibáñez R, Guadix A, Guadix EM. Effect of pH on the fractionation of whey proteins with a ceramic ultrafiltration membrane. *J Memb Sci.* 2007;288(1–2):28–35.
131. Szymański K, Morawski AW, Mozia S. Effectiveness of treatment of secondary effluent from a municipal wastewater treatment plant in a photocatalytic membrane reactor and hybrid UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – ultrafiltration system. *Chem Eng Process - Process Intensif.* 2018;125:318–24. /10.1016/j.cep.2017.11.015
132. Rehman ZU, Khojah B, Leiknes T, Alsogair S, Alsomali M. Removal of bacteria and organic carbon by an integrated ultrafiltration—nanofiltration desalination pilot plant. *Membranes (Basel).* 2020;10(9):1–12.
133. Gilewicz-Łukasik B, Koter S, Kurzawa J. Concentration of anthocyanins by the membrane filtration. *Sep Purif Technol.* 2007;57(3):418–24.
134. [www.eldercraft.info/en/technology](http://www.eldercraft.info/en/technology). 19.12.2021.

135. Mohammad AW, Teow YH, Ang WL, Chung YT, Oatley-Radcliffe DL, Hilal N. Nanofiltration membranes review: Recent advances and future prospects. *Desalination*. 2015;356:226–54. /10.1016/j.desal.2014.10.043
136. Radjenović J, Petrović M, Ventura F, Barceló D. Rejection of pharmaceuticals in nanofiltration and reverse osmosis membrane drinking water treatment. *Water Res*. 2008;42(14):3601–10.
137. Clara M, Strenn B, Gans O, Martinez E, Kreuzinger N, Kroiss H. Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and endocrine disrupting compounds in a membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants. *Water Res*. 2005;39(19):4797–807.
138. Galanakis CM. Separation of functional macromolecules and micromolecules: From ultrafiltration to the border of nanofiltration. *Trends Food Sci Technol*. 2015;42:44–63. /10.1016/j.tifs.2014.11.005
139. Van der Bruggen B. Microfiltration, ultrafiltration, nanofiltration, reverse osmosis, and forward osmosis. In: *Fundamental Modeling of Membrane Systems: Membrane and Process Performance*. Elsevier Inc.; 2018. p. 25–70. /10.1016/B978-0-12-813483-2.00002-2
140. Lee KP, Arnot TC, Mattia D. A review of reverse osmosis membrane materials for desalination-Development to date and future potential. *J Memb Sci*. 2011;370(1–2):1–22. /10.1016/j.memsci.2010.12.036
141. Baker RW. *Membrane technology and applications*. Membrane Technologies and Applications. John Wiley & Sons, Inc.; 2011. 1-485 p.
142. Cui ZF, Jiang Y, Field RW. *Fundamentals of Pressure-Driven Membrane Separation Processes*. In: *Membrane Technology*. First Edit. Elsevier Ltd; 2010. p. 1–18. /10.1016/B978-1-85617-632-3.00001-X
143. Yang Z, Zhou Y, Feng Z, Rui X, Zhang T, Zhang Z. A review on reverse osmosis and nanofiltration membranes for water purification. *Polymers (Basel)*. 2019;11(8):1–22.
144. Saikia J, Sarmah S, Bora JJ, Das B, Goswamee RL. Preparation and characterization of low cost flat ceramic membranes from easily available potters' clay for dye separation. *Bull Mater Sci*. 2019;42(3):1–13. doi.org/10.1007/s12034-019-1767-7
145. Yang Z, Tang CY. Novel membranes and membrane materials. In: *Membrane-Based Salinity Gradient Processes for Water Treatment and Power Generation*. Elsevier B.V.; 2018. p. 201–21. /10.1016/B978-0-444-63961-5.00007-9
146. Gohil JM, Suresh AK. Chlorine attack on reverse osmosis membranes: Mechanisms and

- mitigation strategies. *J Memb Sci.* 2017;541(March):108–26. /10.1016/j.memsci.2017.06.092
147. Khorshidi B, Thundat T, Fleck BA, Sadrzadeh M. A novel approach toward fabrication of high performance thin film composite polyamide membranes. *Sci Rep.* 2016;6(February):1–10.
  148. Jedlinska A, Samborska K, Witrowa-Rajchert D. Aspekty techniczno-technologiczne suszenia miodu. *Nauk Inżynierskie i Technol / Uniw Ekon we Wrocławiu.* 2012;2(5):35–43.
  149. Krishnaiah D, Nithyanandam R, Sarbatly R. A Critical Review on the Spray Drying of Fruit Extract: Effect of Additives on Physicochemical Properties. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2014;54(4):449–73.
  150. Jafari SM, Ghalegi Ghalenoei M, Dehnad D. Influence of spray drying on water solubility index, apparent density, and anthocyanin content of pomegranate juice powder. *Powder Technol.* 2017;311:59–65. /10.1016/j.powtec.2017.01.070
  151. Samborska K. Suszenie rozpyłowe w przemyśle spożywczym. *Postępy Tech Przetwórstwa Spożywczego.* 2008;1:63–9.
  152. Gohel MC, Parikh RK, Nagori SA, Gandhi A V., Shroff MS, Patel PK, et al. Spray drying: A review. *Pharm Rev.* 2009;7:1–23.
  153. Filkova I, Huang LX, Mujumdar AS. Industrial spray drying systems. In: Mujumdar AS, editor. *Handbook of Industrial Drying.* Taylor & Francis Group, New York; 2007.
  154. Desobry S a, Netto FM, Labuza TP. Comparison of Spray-drying, Drum-drying and Freeze-drying for  $\beta$ -Carotene Encapsulation and Preservation. *J Food Sci.* 1997;62(6):1158–62.
  155. Horszwald A, Julien H, Andlauer W. Characterisation of Aronia powders obtained by different drying processes. *Food Chem.* 2013;141(3):2858–63. /10.1016/j.foodchem.2013.05.103
  156. Samborska K, Witrowa-Rajchert D, Gonçalves A. Spray-drying of  $\alpha$ -amylase - The effect of process variables on the enzyme inactivation. *Dry Technol.* 2005;23(4):941–53.
  157. Anandharamkrishnan C, Rielly CD, Stapley AGF. Effects of process variables on the denaturation of whey proteins during spray drying. *Dry Technol.* 2007;25(5):799–807.
  158. Zielińska A., Siudem P., Paradowska K., Gralec M., Kaźmierski S. WI. Aronia melanocarpa Fruits as a Rich Dietary Source of. *Molecules.* 2020;25:3234–49.
  159. Sikora K., Jurczak M., Jarysz M. BW. Oznaczanie zawartości flawonoidów i związków

- polifenolowych w kwiatach przelotu pospolitego *Anthyllis vulneraria* L. *Postępy Fitoter.* 2011;2:85–8.
160. Gardana C, Scialpi A, Fachechi C, Simonetti P. Near-infrared spectroscopy and chemometrics for the routine detection of bilberry extract adulteration and quantitative determination of the anthocyanins. *J Spectrosc.* 2018;2018. doi.org/10.1155/2018/4751247
  161. Hwang SJ, Kim YW, Park Y, Lee HJ, Kim KW. Anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in lipopolysaccharide- stimulated RAW 264.7 cells. *Inflamm Res.* 2014;63(1):81–90. doi.org/10.1007/s00011-013-0674-4
  162. Ji H, Pettit A, Ohmura K, Ortiz-Lopez A, Duchatelle V, Degott C, et al. Critical Roles for Interleukin 1 and Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  in Antibody-induced Arthritis. *J Exp Med.* 2002;196(1):77–85.
  163. Feghali CA, Wright TM. Cytokines in Acute and chronic inflammation. *Front Biosci.* 1997;2:12–26. www.bioscience.org/1997/v2/d/feghali1/htmls/feghali.pdf
  164. Berridge M V., Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev.* 2005;11(SUPPL.):127–52. doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11004-7
  165. Hambleton J, Weinstein SL, Lem L, Defranco AL. Activation of c-Jun N-terminal kinase in bacterial lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(7):2774–8. doi.org/10.1073/pnas.93.7.2774
  166. Vagiri M, Jensen M. Influence of juice processing factors on quality of black chokeberry pomace as a future resource for colour extraction. *Food Chem.* 2017;217:409–17. /10.1016/j.foodchem.2016.08.121
  167. Oszmiański J, Lachowicz S. Effect of the production of dried fruits and juice from chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) on the content and antioxidative activity of bioactive compounds. *Molecules.* 2016;21(8).
  168. Białek M, Rutkowska J, Hallmann E. Aronia czarnoowocowa (*Aronia melanocarpa*) jako potencjalny składnik żywności funkcjonalnej. *Zywn Nauk Technol Jakośc/Food Sci Technol Qual.* 2012;19(6):21–30.
  169. Tarko T, Duda-Chodak A, Bebak A. Aktywność biologiczna wybranych wyłoków owocowych oraz warzywnych. *Żywność Nauk Technol Jakość.* 2012;19(4):55–65.
  170. Čujić N, Šavikin K, Janković T, Pljevljakušić D, Zdunić G, Ibrić S. Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Food Chem.* 2016;194:135–42.

171. Koh J, Xu Z, Wicker L. Binding kinetics of blueberry pectin-anthocyanins and stabilization by non-covalent interactions. *Food Hydrocoll.* 2020;99(September 2019):105354. doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105354
172. Padayachee A, Netzel G, Netzel M, Day L, Zabarar D, Mikkelsen D, et al. Binding of polyphenols to plant cell wall analogues - Part 1: Anthocyanins. *Food Chem.* 2012;134(1):155–61. /10.1016/j.foodchem.2012.02.082
173. Petreska Stanoeva J, Balshikevska E, Stefova M, Tusevski O, Simic SG. Comparison of the Effect of Acids in Solvent Mixtures for Extraction of Phenolic Compounds From *Aronia melanocarpa*. *Nat Prod Commun.* 2020;15(7).
174. Dembczyński R, Białas W, Olejnik A, Kowalczewski P, Drożdżyńska A, Jankowski T. Pozyskiwanie antocyjanów z owoców aronii, czarnego bzu, czarnej porzeczki i korzenia czarnej marchwi metodą ekstrakcji. *Zywn Nauk Technol Jakosc/Food Sci Technol Qual.* 2015;22(5):165–81.
175. Brazdauskas T, Montero L, Venskutonis PR, Ibañez E, Herrero M. Downstream valorization and comprehensive two-dimensional liquid chromatography-based chemical characterization of bioactives from black chokeberries (*Aronia melanocarpa*) pomace. *J Chromatogr A.* 2016;1468:126–35.
176. Han S, Hauzer A. Polish patent PL 192692 B1. 2000.
177. Dz. Urz. UE L 304/18. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) nr 1169/2011 z dnia 25 października 2011 r. w sprawie przekazywania konsumentom informacji na temat żywności (Dz. Urz. UE L 304/18 z 22.11.2011, z późn. zm.). *Dz Urz UE L 304/18 z 22112011.* 2011;18–63.
178. Berké B, Chèze C, Vercauteren J, Deffieux G. Bisulfite addition to anthocyanins: Revisited structures of colourless adducts. *Tetrahedron Lett.* 1998;39(32):5771–4.
179. Nikolantonaki M, Magiatis P, Waterhouse AL. Direct and fast Analysis of Free and Sulfite-Bound Carbonyl Compounds in Wine by Two-Dimensional Quantitative Proton and Carbon Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Vol. 87, *Analytical Chemistry.* 2015. 10799-10806 p.
180. Fulcrand H, Dueñas M, Salas E, Cheynier V. Phenolic reactions during winemaking and aging. *Am J Enol Vitic.* 2006;57(3):289–97.
181. Roda-Serrat MC, Andrade TA, Rindom J, Lund PB, Norddahl B, Errico M. Optimization of the Recovery of Anthocyanins from Chokeberry Juice Pomace by Homogenization in Acidified Water. *Waste and Biomass Valorization.* 2021;12(4):1815–27. doi.org/10.1007/s12649-020-01127-w

182. Roda-Serrat MC, Andrade TA, Errico M. Optimization of the Anthocyanins extraction process from Aronia berries pomace. *Bulg Chem Commun.* 2019;51:106–7.
183. Todaro A, Cimino F, Rapisarda P, Catalano AE, Barbagallo RN, Spagna G. Recovery of anthocyanins from eggplant peel. *Food Chem.* 2009;114(2):434–9. /10.1016/j.foodchem.2008.09.102
184. Struck S, Plaza M, Turner C, Rohm H. Berry pomace - A review of processing and chemical analysis of its polyphenols. *Int J Food Sci Technol.* 2016;51(6):1305–18.
185. Kaack K. Processing of anthocyanin colourant from elderberry (*Sambucus nigra* L.) pomace. *Tidsskr Planteavl.* 1990;94:423–9.
186. Silva M, Castellanos L, Ottens M. Capture and Purification of Polyphenols Using Functionalized Hydrophobic Resins. *Ind Eng Chem Res.* 2018;57(15):5359–69.
187. Gogoi P, Dutta NN, Rao PG. Adsorption of catechin from aqueous solutions on polymeric resins and activated carbon. *Indian J Chem Technol.* 2010;17(5):337–45.
188. Chandrasekhar J, Madhusudhan MC, Raghavarao KSMS. Extraction of anthocyanins from red cabbage and purification using adsorption. *Food Bioprod Process.* 2012;90(4):615–23. /10.1016/j.fbp.2012.07.004
189. Heinonen J, Farahmandazad H, Vuorinen A, Kallio H, Yang B, Sainio T. Extraction and purification of anthocyanins from purple-fleshed potato. *Food Bioprod Process.* 2016;99:136–46. /10.1016/j.fbp.2016.05.004
190. Galván D’Alessandro L, Vauchel P, Przybylski R, Chataigné G, Nikov I, Dimitrov K. Integrated process extraction-adsorption for selective recovery of antioxidant phenolics from Aronia melanocarpa berries. *Sep Purif Technol.* 2013;120:92–101.
191. Čujić-Nikolić N, Stanisavljević N, Šavikin K, Kalušević A, Nedović V, Samardžić J, et al. Chokeberry polyphenols preservation using spray drying: effect of encapsulation using maltodextrin and skimmed milk on their recovery following in vitro digestion. *J Microencapsul.* 2019;36(8):693–703. doi.org/10.1080/02652048.2019.1667448
192. Upton R. Bilberry Fruit *Vaccinium myrtillus* L. Standards of Analysis, Quality Control, and Therapeutics. In: *American Herbal Pharmacopoeia and Therapeutic Compendium.* Santa Cruz, CA; 2001. p. 1–6.
193. Wing-kwan C, Sabrina C. M., Cheung Roxanna A. W. L, Iris F. F. B. Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects. 2nd edition. In: *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects* 2nd edition. CRC Press/Taylor & Francis; 2011.
194. Meng L, Lozano Y, Bombarda I, Gaydou E, Li B. Anthocyanin and flavonoid production from *Perilla frutescens*: Pilot plant scale processing including cross-flow microfiltration

- and reverse osmosis. *J Agric Food Chem.* 2006;54(12):4297–303.
195. Cisse M, Vaillant F, Soro D, Reynes M, Dornier M. Crossflow microfiltration for the cold stabilization of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. *J Food Eng.* 2011;106(1):20–7. /10.1016/j.jfoodeng.2011.04.001
  196. CHUNG MY, HWANG LS, CHIANG BH. Concentration of Perilla Anthocyanins by Ultrafiltration. *J Food Sci.* 1986;51:1494–7.
  197. Mazza G, Brouillard R. The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions. *Phytochemistry.* 1990;29(4):1097–102.
  198. Pap N, Mahosenaho M, Pongrácz E, Mikkonen H, Jaakkola M, Virtanen V, et al. Effect of Ultrafiltration on Anthocyanin and Flavonol Content of Black Currant Juice (*Ribes nigrum* L.). *Food Bioprocess Technol.* 2012;5(3):921–8.
  199. Cassano A, Conidi C, Drioli E. Physico-chemical parameters of cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) juice clarified by microfiltration and ultrafiltration processes. *Desalination.* 2010;250(3):1101–4.
  200. Lin Z, Fischer J, Wicker L. Intermolecular binding of blueberry pectin-rich fractions and anthocyanin. *Food Chem.* 2016;194:986–93. /10.1016/j.foodchem.2015.08.113
  201. Sun YAN, Li L. Cyanidin-3-glucoside inhibits inflammatory activities in human fibroblast-like synoviocytes and in mice with collagen-induced arthritis. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2018;45(10):1038–45. [onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1440-1681.12970](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1440-1681.12970)
  202. Ferrari D, Cimino F, Fratantonio D, Molonia MS, Bashllari R, Busà R, et al. Cyanidin-3-O-Glucoside Modulates the in Vitro Inflammatory Crosstalk between Intestinal Epithelial and Endothelial Cells. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:1–8. [doi.org/10.1155/2017/3454023](https://doi.org/10.1155/2017/3454023)
  203. Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Anal Biochem.* 2017;524:13–30. /10.1016/j.ab.2016.10.021
  204. Cai Z, Song L, Qian B, Xu W, Ren J, Jing P, et al. Understanding the effect of anthocyanins extracted from purple sweet potatoes on alcohol-induced liver injury in mice. *Food Chem.* 2018;245(October 2017):463–70. [doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.119](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.119)
  205. Santos VDS, Bisen-Hersh E, Yu Y, Cabral ISR, Nardini V, Culbreth M, et al. Anthocyanin-rich açai (*Euterpe oleracea* Mart.) extract attenuates manganese-induced oxidative stress in rat primary astrocyte cultures. *J Toxicol Environ Heal - Part A Curr*

- Issues. 2014;77(7):390–404. doi.org/10.1080/15287394.2014.880392
206. Kardum N, Konić-Ristić A, Šavikin K, Spasić S, Stefanović A, Ivanišević J, et al. Effects of Polyphenol-Rich Chokeberry Juice on Antioxidant/Pro-Oxidant Status in Healthy Subjects. *J Med Food*. 2014;17(8):869–74. doi.org/10.1089/jmf.2013.0135
207. Lyall KA, Hurst SM, Cooney J, Jensen D, Lo K, Hurst RD, et al. Short-term blackcurrant extract consumption modulates exercise-induced oxidative stress and lipopolysaccharide-stimulated inflammatory responses. *Am J Physiol Integr Comp Physiol*. 2009;297(1):R70–81. doi.org/10.1152/ajpregu.90740.2008
208. Murkovic M, Abuja PM, Bergmann AR, Zirngast A, Adam U, Winklhofer-Roob BM, et al. Effects of elderberry juice on fasting and postprandial serum lipids and low-density lipoprotein oxidation in healthy volunteers: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Eur J Clin Nutr*. 2004;58(2):244–9. doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601773
209. Medic N, Tramer F, Passamonti S. Anthocyanins in colorectal cancer prevention. A systematic review of the literature in search of molecular oncotargets. *Front Pharmacol*. 2019;10.
210. Maciel LG, do Carmo MAV, Azevedo L, Daguer H, Molognoni L, de Almeida MM, et al. Hibiscus sabdariffa anthocyanins-rich extract: Chemical stability, in vitro antioxidant and antiproliferative activities. *Food Chem Toxicol*. 2018;113:187–97. doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.053
211. Pereira DI, Amparo TR, Almeida TC, Costa FSF, Brandão GC, Santos ODH dos, et al. Cytotoxic activity of butanolic extract from *Sambucus nigra* L. flowers in natura and vehiculated in micelles in bladder cancer cells and fibroblasts. *Nat Prod Res*. 2020;Nov 25:1–9. doi.org/10.1080/14786419.2020.1851220
212. Yi W, Fischer J, Akoh CC. Study of anticancer activities of muscadine grape phenolics in vitro. *J Agric Food Chem*. 2005;53:8804–12.
213. Reddivari L, Vanamala J, Chintharlapalli S, Safe SH, Miller JC. Anthocyanin fraction from potato extracts is cytotoxic to prostate cancer cells through activation of caspase-dependent and caspase-independent pathways. *Carcinogenesis*. 2007;28:2227–35.
214. Shih PH, Yeh CT, Yen GC. Effects of anthocyanidin on the inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human gastric adenocarcinoma cells. *Food Chem Toxicol*. 2005;43:1557–66.
215. Gleńsk M, Czapińska E, Woźniak M, Ceremuga I, Włodarczyk M, Terlecki G, et al. Triterpenoid Acids as Important Antiproliferative Constituents of European Elderberry Fruits. *Nutr Cancer*. 2017;69:643–51.



216. Chowdhury SR, Ray U, Chatterjee BP, Roy SS. Targeted apoptosis in ovarian cancer cells through mitochondrial dysfunction in response to Sambucus nigra agglutinin. *Cell Death Dis.* 2017;8:e2762-12. /10.1038/cddis.2017.77
217. Mandal P, Molla AR. Solvent Perturbation of Protein Structures - A Review Study with Lectins. *Protein Pept Lett.* 2019;6:538–50.
218. Bahiense JB, Marques FM, Figueira MM, Vargas TS, Kondratyuk TP, Endringer DC, et al. Potential anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial activities of *Sambucus australis*. *Pharm Biol.* 2017;55:991–7. /10.1080/13880209.2017.1285324
219. Barak V, Halperin T, Kalickman I. The effect of Sambucol, a black elderberry-based, natural product, on the production of human cytokines: I. Inflammatory cytokines. *Eur Cytokine Netw.* 2001;12:290–6.
220. Dai J, Gupte A, Gates L, Mumper RJ. A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: Extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. *Food Chem Toxicol.* 2009;47:837–47. /10.1016/j.fct.2009.01.016
221. Ampasavate C, Okonogi S, Anuchapreeda S. Cytotoxicity of extracts from fruit plants against leukemic cell lines. *J Pharm Pharmacol.* 2010;4:013–21.
222. Fan MJ, Yeh PH, Lin JP, Huang AC, Lien JC, Lin HY, et al. Anthocyanins from black rice (*Oryza sativa*) promote immune responses in leukemia through enhancing phagocytosis of macrophages in vivo. *Exp Ther Med.* 2017;14:59–64.
223. Decendit A, Mamani-Matsuda M, Aumont V, Waffo-Teguo P, Moynet D, Boniface K, et al. Malvidin-3-O- $\beta$  glucoside, major grape anthocyanin, inhibits human macrophage-derived inflammatory mediators and decreases clinical scores in arthritic rats. *Biochem Pharmacol.* 2013;86:1461–7.
224. Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, et al. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J Agric Food Chem.* 1999;47(10):3954–62. doi.org/10.1021/jf9901461
225. Wang Y, Zhao L, Wang D, Huo Y, Ji B. Anthocyanin-rich extracts from blackberry, wild blueberry, strawberry, and chokeberry: Antioxidant activity and inhibitory effect on oleic acid-induced hepatic steatosis in vitro. *J Sci Food Agric.* 2016;96(7):2494–503. doi.org/10.1002/jsfa.7370
226. Rodríguez-Werner M, Winterhalter P, Esatbeyoglu T. Phenolic Composition, Radical Scavenging Activity and an Approach for Authentication of *Aronia melanocarpa* Berries, Juice, and Pomace. *J Food Sci.* 2019;84(7):1791–8.

227. Denev P, Ciz M, Ambrozova G, Lojek A, Yanakieva I, Kratchanova M. Solid-phase extraction of berries' anthocyanins and evaluation of their antioxidative properties. *Food Chem.* 2010;123:1055–61. /10.1016/j.foodchem.2010.05.061
228. Mota JP, Lyubchik S, editors. Adsorption properties of polymer adsorbents. In: *Recent Advances in Adsorption Processes for Environmental Protection and Security*. 1st ed. Springer, Dordrecht; 2008. p. 65–74.
229. Finn2 JL and CE. Anthocyanins and other polyphenolics in American elderberry (*Sambucus canadensis*) and European elderberry (*S. nigra*) cultivars. *J Sci Food Agric.* 2007;87:2665–2675.
230. Bridle P, García-Viguera C. Analysis of anthocyanins in strawberries and elderberries. A comparison of capillary zone electrophoresis and HPLC. *Food Chem.* 1997;59:299–304.
231. Ricardo F. R. da Silva , João C. M. Barreira, Sandrina A. Heleno LB, Ricardo C. Calhella and Isabel C. F. R. Ferreira. Anthocyanin Profile of Elderberry Juice: Potential Food Application. *Molecules.* 2019;24:2359–72.
232. Silva P, Ferreira S, Nunes FM. Elderberry (*Sambucus nigra* L.) by-products a source of anthocyanins and antioxidant polyphenols. *Ind Crop Prod.* 2017;95:227–34. /10.1016/j.indcrop.2016.10.018
233. Kaack K, Fretté XC, Christensen LP, Landbo AK, Meyer AS. Selection of elderberry (*Sambucus nigra* L.) genotypes best suited for the preparation of juice. *Eur Food Res Technol.* 2008;226:843–55.
234. Mikulic-Petkovsek M, Ivancic A, Todorovic B, Veberic R, Stampar F. Fruit Phenolic Composition of Different Elderberry Species and Hybrids. *J Food Sci.* 2015;80(10):C2180–90.
235. Gardana C, Ciappellano S, Marinoni L, Fachechi C, Simonetti P. Bilberry adulteration: Identification and chemical profiling of anthocyanins by different analytical methods. *J Agric Food Chem.* 2014;62(45):10998–1004.
236. Penman KG, Halstead CW, Matthias A, De Voss JJ, Stuthe JMU, Bone KM, et al. Bilberry adulteration using the food dye amaranth. *J Agric Food Chem.* 2006;54(19):7378–82.

## VIII STRESZCZENIE

Owoce jagodowe, dzięki wysokiej zawartości polifenoli, w szczególności antocyjanów, wykazują korzystny wpływ na zdrowie. Badania potwierdziły korzystny wpływ ekstraktów z owoców takich jak aronia, bez czarny oraz borówka czarna, na układ krążenia, układ immunologiczny oraz działanie przeciwzapalne. Wykazano, że ekstrakt z owoców bzu czarnego a także oczyszczone antocyjany stymulują wychwyt glukozy i kwasów tłuszczowych przez komórki mięśni szkieletowych co jest pomocne w profilaktyce cukrzycy typu drugiego. Ekstrakty z owoców jagodowych, dzięki silnym właściwościom przeciwutleniającym mogą spowalniać procesy starzenia i działać przeciwnowotworowo. Wyciągi suche z owoców jagodowych znajdują też zastosowanie w suplementach diety wspomagających prawidłowe funkcjonowanie narządu wzroku. Ekstrakty o wysokiej zawartości antocyjanów stosowane są również jako naturalny barwnik spożywczy. Końcową formą ekstraktów opracowanych w ramach niniejszej rozprawy jest proszek, dzięki czemu antocyjany są bardziej stabilne a ekstrakt ma znacznie wyższą siłę barwienia w porównaniu z koncentratem soku. Ekstrakty suche, opracowane w ramach doktoratu, zawdzięczają wysoką zawartość antocyjanów wydajnemu procesowi ekstrakcji i separacji oraz niskim stratom antocyjanów w trakcie zagęszczania próżniowego i suszenia rozpyłowego. Prawie cały proces odbywa się w niskiej temperaturze, a kontakt z wysoką temperaturą, w trakcie suszenia rozpyłowego, jest krótkotrwały. Dzięki temu podczas procesu produkcyjnego nie następują znaczne straty antocyjanów.

Badania zostały podzielone na kilka etapów. W pierwszej kolejności określono wydajne warunki ekstrakcji antocyjanów z różnych, dostępnych komercyjnie, surowców takich jak mrożone wytloki i owoce aronii, suszone wytloki i mrożone owoce bzu czarnego oraz mrożone owoce borówki czarnej. Stwierdzono wydajną ekstrakcję antocyjanów za pomocą wodnych roztworów kwasu cytrynowego oraz kwasu fosforowego. Dzięki zastąpieniu, powszechnie stosowanych do ekstrakcji, rozpuszczalników organicznych spożywczymi kwasami, uniknięto problemów technologicznych na etapie zagęszczania ekstraktu. Dzięki temu obniżono również koszty produkcji, ponieważ w przypadku zastosowania rozpuszczalników organicznych, niezbędne jest odparowanie tych rozpuszczalników przed separacją co jest energochłonne i wymaga zastosowania bardziej skomplikowanej linii produkcyjnej.

W dalszej kolejności zbadano proces preparatywnej separacji antocyjanów na makroporowatych żywicach adsorpcyjnych. W ramach tego etapu zbadano również, w skali laboratoryjnej, separację ekstraktów z owoców i wyciągów aronii, bzu czarnego oraz borówki

czarnej o różnej zawartości antocyjanów. Otrzymane ekstrakty, mimo różnej zawartości antocyjanów w surowcu, charakteryzowały się wysoką zawartością antocyjanów w suchej masie, w zdecydowanej większości przekraczającą 25%.

W następnym etapie badań zbadano możliwość zastosowania do separacji antocyjanów ciśnieniowych technik membranowych. Wykorzystano tutaj membrany ceramiczne i polimerowe z zakresu mikrofiltracji (MF), ultrafiltracji (UF) i nanofiltracji (NF). Na membranie mikrofiltracyjnej nie stwierdzono separacji antocyjanów. Z kolei zastosowanie nanofiltracji umożliwiło całkowite zagęszczenie ekstraktu, ale niewystarczające zwiększenie zawartości antocyjanów w suchej masie ekstraktu. Ekstraktów po separacji za pomocą NF nie udało się wysuszyć, co świadczyło o niewystarczającym obniżeniu stężenia cukrów prostych i kwasów organicznych. Antocyjany ekstrahowane z badanych owoców, mimo masy cząsteczkowej w przedziale 419-744 Da, ulegały wydajnej retencji na membranie o punkcie odcięcia (MWCO) 1 kDa. Zbadano wpływ ciśnienia transmembranowego, temperatury, zateżenia ekstraktu oraz diafiltracji, na zawartość antocyjanów w suchej masie ekstraktu. Wykazano, że wyższe ciśnienie transmembranowe oraz niższa temperatura mają korzystny wpływ na retencję antocyjanów na membranie o MWCO wynoszącym 1 kDa. Udowodniono także wzrost zawartości antocyjanów w suchej masie ekstraktu przy wyższym stopniu zateżenia ekstraktu oraz w trakcie diafiltracji. Ekstrakty, po separacji za pomocą ultrafiltracji na membranie 1 kDa można wydajnie wysuszyć gdyż nie przylegają do ścian suszarni rozpyłowej. Świadczy to o obniżeniu zawartości cukrów prostych i dwucukrów, które charakteryzują się niską temperaturą przejścia szklistego uniemożliwiając suszenie.

Kolejny etap prac badawczych polegał na wdrożeniu części opracowanych metod do produkcji w firmie Greenvit Sp. z o. o. Do produkcji wdrożono ekstrakcję oraz separację chromatograficzną. Zagęszczanie próżniowe i suszenie rozpyłowe, prowadzone zgodnie ze stosowanymi wcześniej, standardowymi procedurami, umożliwiło uzyskanie zadowalających wyników. W ramach tego etapu porównano wydajności pięciu partii ekstraktu z bzu czarnego i ekstraktu z borówki czarnej oraz czterech partii ekstraktu z aronii. Całkowity odzysk antocyjanów zawartych w surowcach roślinnych, oprócz jednej partii ekstraktu z bzu czarnego, przekraczał 75%.

Na podstawie przeprowadzonych prac opracowano metody wytwarzania ekstraktów z aronii, bzu czarnego i borówki czarnej. Opracowano również specyfikacje ekstraktów, które weszły już do oferty firmy.

Ekstrakty z aronii i z bzu czarnego poddano również badaniom biologicznym na komórkach hodowlanych. Zbadano właściwości przeciwzapalne oraz przeciwutleniające w warunkach *in vitro* ekstraktu z aronii na makrofagach RAW 264.7. Zbadano i porównano właściwości cytotoksyczne dwóch ekstraktów z owoców bzu czarnego wobec komórek nowotworowych płuc (A549), jajnika (A2780), sutka (MCF-7) i jelita (Caco-2) a także wobec nienowotworowych jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC). Wykazano hamowanie proliferacji komórek nowotworowych jajnika, sutka i jelita, a także stymulację proliferacji komórek PBMC.

## **IX ABSTRACT**

Berries, owing to the high content of polyphenols, in particular anthocyanins, possess a beneficial effect on health. Studies have confirmed positive effect of fruit extracts such as chokeberry, elderberry and bilberry on the circulatory system, immune system and anti-inflammatory properties. It has been shown that elderberry fruit extracts as well as purified anthocyanins stimulate the uptake of glucose and fatty acids by skeletal muscle cells, which is helpful in the prevention of type 2 diabetes. Berry fruit extracts, due to their strong antioxidant properties, can slow down the aging process and have anti-cancer properties. Dry extracts from berry fruits are also used in dietary supplements supporting the proper functioning of the eyesight. Extracts with high anthocyanin content are used moreover as the natural food colorant.

The final form of the extracts developed within this PhD thesis is a powder, because the anthocyanins are more stable and the extract has a much higher coloring power compared to the juice concentrate. Almost the entire process takes place at low temperature and the contact with high temperature during spray drying is very short. This results in only slight decrease in anthocyanins amount during the production process.

The research was divided into several stages. In the first stage, efficient conditions for the extraction of anthocyanins from various commercially available raw materials, such as frozen pomace and chokeberry fruits, dried pomace and frozen elderberry fruits, and frozen blueberry fruits, were developed. It was found that aqueous solutions of citric acid and phosphoric acid are efficient anthocyanins extractant. By replacing the organic solvents, which are commonly used in extraction of anthocyanins, with food grade acids, technological problems at the extract concentration step were avoided. Owing to that, the production costs were also reduced, because in the case of using organic solvents, it is necessary to evaporate these solvents before separation, which is energy-consuming and requires the use of a more complex production facilities.

In the next step, the process of preparative anthocyanin separation on macroporous adsorption resins was investigated. The separation of the extracts from pomace and the fruits of chokeberry, elderberry and from bilberry fruits with different anthocyanin content was investigated under laboratory conditions. The obtained extracts, despite the different contents of anthocyanins in raw materials, were characterized by a high content of anthocyanins in dry matter, in the vast majority exceeding 25%.

In the following stage of the research, the possibility of using pressure-driven membrane techniques for the separation of anthocyanins was investigated. Microfiltration (MF), ultrafiltration (UF) and nanofiltration (NF) ceramic and polymeric membranes were tested. No anthocyanin separation was found on the microfiltration membrane. The use of nanofiltration made it possible to thicken the extract however insufficient increase the anthocyanin content in the dry matter of the extract was found. Attempts to dry the extract after separation with NF failed, which indicated an insufficient reduction in the concentration of mono- and disaccharides which are the compounds with low glass transition temperature. Ultrafiltration was successfully applied. Anthocyanins extracted from selected fruits, despite the molecular weight in the range of 419-744 Da, were efficiently rejected on the UF membrane with the molecular weight cut-off (MWCO) of 1 kDa. The influence of transmembrane pressure, temperature, concentration of the extract and diafiltration on the content of anthocyanins in the dry matter of the extract was investigated. It has been proven that higher transmembrane pressure and lower temperature have a beneficial effect on the retention of anthocyanins on a membrane with a MWCO of 1 kDa. An increase in the content of anthocyanins in the dry matter of the extract was also proven with a higher concentration of the extract and during diafiltration. After separation by ultrafiltration on a 1 kDa membrane, the extracts can be efficiently dried because they do not adhere to the walls of the spray dryer. This proves the reduction of the content of mono- and disaccharides.

The next stage of research work was the implementation of some of the developed methods for production at Greenvit Sp. z o. o. At the present stage, extraction and chromatographic separation have been implemented. Vacuum compaction and spray drying in accordance with the previously used standard procedures made it possible to obtain satisfactory results. In this step, the yields of five batches of elderberry extract and bilberry extract and four batches of chokeberry extract were compared. The total recovery of anthocyanins contained in plant raw materials, except for one batch of elderberry extract, exceeded 75%.

On the basis of the researches, methods of producing chokeberry, elderberry and bilberry extracts were developed in the production scale. Specifications have also been developed for extracts which have already been included in the company's offer


Aronia and elderberry extracts were also subjected to tests on cultured cells. The *in vitro* anti-inflammatory and antioxidant properties of chokeberry extract on RAW 264.7 macrophages were tested. The cytotoxic properties of two elderberry extracts against tumor

cells of the lung (A549), ovary (A2780), breast (MCF-7) and intestine (Caco-2) as well as against non-neoplastic peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were tested and compared. Both extracts have been shown to inhibit the proliferation of ovarian, breast and intestinal cancer cells as well as to stimulate the proliferation of PBMCs. However here was no inhibition of lung cancer cell proliferation.



## **X      ZAŁĄCZNIKI**


Załącznik nr 1. Specyfikacja suchego ekstraktu z aronii (AronVit™) standaryzowanego na minimum 25% antocyjanów.

 <p>Greenvit Sp. z o.o. Al. Wojska Polskiego 27A 18-300 Zambrow <a href="http://greenvit.pl/">http://greenvit.pl/</a></p>	<b>SPECYFIKACJA JAKOŚCIOWA</b> <b>QUALITY SPECIFICATION</b>	<b>Nr/No:</b> E109206 <b>Wersja B/ Version B</b> <b>Wydanie: 6/ Issue: 6</b>
	<b>Aronvit® 25% - Suchy ekstrakt z owocu aronii</b> <b>Aronvit® 25% - Aronia berry dry extract</b>	<b>Data wydania/</b> <b>Date of issue:</b> 01.10.2021
	<b>Aronia melanocarpa (Michx.) Elliott</b>	<b>Strona/Page:</b> 1/5

<b>PRODUKT /PRODUCT: ARONVIT® 25% - SUCHY EKSTRAKT Z OWOCU ARONII/ Aronvit® 25% - Aronia berry dry extract</b>		
<b>1. Opis produktu /Main characteristic</b>		
• <b>Wygląd/Appearance</b>	<b>Proszek barwy czarnej do ciemnopurpurowej/ Black to dark purple fine powder</b>	
• <b>Część rośliny/Part of plant used</b>	<b>Jagoda (owoc)/Berry (fruit)</b>	
• <b>Rozpuszczalnik ekstrakcyjny/Extraction solvent</b>	<b>Etanol/Ethanol</b> <b>Woda/Water</b>	
• <b>Rozdrobnienie/Mesh</b>	<b>80 mesh</b>	
• <b>Nośnik/Carrier</b>	<b>Maltodekstryna/Maltodextrin</b>	
• <b>Kod produktu/Code number</b>	<b>E109206</b>	
• <b>Kraj pochodzenia surowca/Country of origin of the raw material</b>	<b>EU/UE</b>	
• <b>Kraj produkcji ekstraktu/Country of origin of the extract</b>	<b>Polska/Poland</b>	
<b>2. Charakterystyka fizykochemiczna/Physico-Chemical parameters</b>		
	<b>Metoda/Method</b>	<b>Specyfikacja/Specification</b>
• <b>Strata masy po suszeniu/Loss on drying</b>	FP XII/Ph.Eur.01/2008:20817	< 5 % (m/m)
• <b>Zawartość antocyjanów/Anthocyanins content</b>	HPLC	min. 25%
• <b>Zawartość polifenoli/Polyphenols content</b>	UV	min.50%
• <b>*Metale ciężkie/Heavy metals (mg/kg)</b>	PB-68/ICP ed III from 18.09.2012 PB-68/ICP ed III from 18.09.2012 PB-30/CVAAS ed V from 18.09.2012	<b>Ołów/Lead:</b> <= 3.0 mg/kg <b>Kadm/Cadmium:</b> <= 1.0 mg/kg <b>Rtęć/Mercury:</b> <= 0.1 mg/kg
• <b>*Aflatoksyna B<sub>1</sub>/Aflatoxin<sub>1</sub> (µg/kg)</b>	PB-30 ed V from 01.02.2019	< 2 µg/kg
• <b>*Σ Aflatoksyn B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>/Aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> (µg/kg)</b>	PB-30 ed V from 01.02.2019	< 4µg/kg
• <b>*Pestycydy/Pesticides</b>	PN-EN 15662:2018-06	<b>Zgodny/Compatible</b>
• <b>*Σ WWA/Σ PAH's (Benzo(a)piren, Benz(a)antracen, Chryzen, Benzo(a)fluoranten (µg/kg)</b>	PB-117/HPLC ed VI from 20.01.2019	<= 50.0µg/kg
• <b>*Benzo(a)piren (µg/kg)</b>	PB-117/HPLC ed VI from 20.01.2019	<= 10.0µg/kg
* - Wg Planu Badań (min.1/rok)/According to the research plan (min.1/year)		
<b>3. Charakterystyka mikrobiologiczna/Microbiological parameters</b>		
	<b>Metoda/Method</b>	<b>Specyfikacja/Specification</b>

**Complementary data:**

We thank you to take note of these documents. Without any news from you within 48 hours after reception, these enclosed documents will be considered as accepted.


 <b>Greenvit</b> <small>INDUSTRIAL EXTRACTS MANUFACTURER</small> Greenvit Sp. z o.o. Al. Wojska Polskiego 27A 18-300 Zambrow <a href="http://greenvit.pl/">http://greenvit.pl/</a>	<b>SPECYFIKACJA JAKOŚCIOWA</b> <b>QUALITY SPECIFICATION</b>	<b>Nr/No:</b> E109206 <b>Wersja B/ Version B</b> <b>Wydanie: 6/ Issue: 6</b>
	<b>Aronvit® 25% - Suchy ekstrakt z owocu aronii</b> <b>Aronvit® 25% - Aronia berry dry extract</b>	<b>Data wydania/</b> <b>Date of issue:</b> 01.10.2021
	<b><i>Aronia melanocarpa (Michx.) Elliott</i></b>	<b>Strona/Page:</b> 2/5

<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Całkowita liczba drobnoustrojów jtk/g/Bacterial count (CFU/g)</b></li> </ul>	PN-EN ISO 4833-1:2013-12	< 10 <sup>4</sup> jtk/g
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Liczba grzybów (pleśnie i drożdże) jtk/g/Yeasts &amp; Moulds (CFU/g)</b></li> </ul>	PN-ISO 21527:2:2009	< 10 <sup>2</sup> jtk/g
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b><i>Escherichia coli</i></b></li> </ul>	PN-ISO 7251:2006	Nieobecna w 1 g/Negative in 1 g
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b><i>Salmonella spp.</i></b></li> </ul>	PN-EN ISO 6579-1:2017-04	Nieobecna w 25 g/Negative in 25 g

<b>4. Warunki przechowywania/Storage conditions</b>		
Przechowywać w temperaturze poniżej 25°C, w szczelnie zamkniętym opakowaniu, z dala od światła słonecznego, wilgoci i źródeł ciepła/Store at temperature below 25°C, in a well closed bag away from moisture and direct sun light		
<b>5. Okres ważności/Shelf life</b>		
24 miesiące pod warunkiem właściwego przechowywania/24 months from the production		
<b>6. Materiał opakowaniowy/Packaging</b>		
Worek 2 x 5 kg (PET12/AL8/PE) zapakowany w kartonowe opakowanie zbiorcze/2 x 5 kg bag (PET12/AL8/PE) packaged in cardboard collective		
<b>7. Znakowanie/Marking</b>		
Dane podane na etykiecie umieszczonej na opakowaniu powinny zawierać/ Adhesive label should be attached to all unit packaging and include:		
- nazwa produktu/product name		
- kod produktu/code number		
- nr partii/batch number		
- data produkcji/production date		
- data minimalnej trwałości/date of minimum durability		
- masa netto/net weight		
- przechowywanie/storage conditions		
- adres Dostawcy/ producer name and address		

**Complementary data:**

We thank you to take note of these documents. Without any news from you within 48 hours after reception, these enclosed documents will be considered as accepted.

 <p>Greenvit Sp. z o.o. Al. Wojska Polskiego 27A 18-300 Zambrow <a href="http://greenvit.pl/">http://greenvit.pl/</a></p>	<b>SPECYFIKACJA JAKOŚCIOWA QUALITY SPECIFICATION</b>	<b>Nr/No: E109206</b> <b>Wersja B/ Version B</b> <b>Wydanie: 6/ Issue: 6</b>
	<b>Aronvit® 25% - Suchy ekstrakt z owocu aronii</b> <b>Aronvit® 25% - Aronia berry dry extract</b>	<b>Data wydania/ Date of issue: 01.10.2021</b>
	<b><i>Aronia melanocarpa (Michx.) Elliott</i></b>	<b>Strona/Page: 3/5</b>


## DODATKOWE WYMAGANIA / ADDITIONAL INFORMATION ABOUT FOOD SAFETY

### a) GMO

OŚWIADCZENIE O GMO (ORGANIZMACH GENETYCZNIE MODYFIKOWANYCH)	STATEMENT CONCERNING THE USE OF GENETIC ENGINEERING
<p>Po uprzednim sprawdzeniu u naszych Dostawców potwierdzamy w niniejszym oświadczeniu, że składniki użyte do produkcji wyżej wymienionego produktu nie zawierają oraz nie zostały wytworzone z organizmów genetycznie modyfikowanych</p> <p style="text-align: center;">Podstawa prawna:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li><u>Rozporządzenie (WE) nr 1829/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 22 września 2003 r. w sprawie genetycznie zmodyfikowanej żywności i paszy.</u></li> <li><u>Rozporządzenie (WE) nr 1830/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 22 września 2003 r. dotyczące możliwości śledzenia i etykietowania organizmów zmodyfikowanych genetycznie oraz możliwości śledzenia żywności i produktów paszowych wyprodukowanych z organizmów zmodyfikowanych genetycznie i zmieniające dyrektywę 2001/18/WE</u></li> </ol>	<p>The above-mentioned products does not contain GMOs and does not contain GMO labeled raw materials</p> <p style="text-align: center;">Legal base:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li><u>Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed.</u></li> <li><u>Regulation (EC) No 1830/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 concerning the traceability and labeling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive 2001/18/EC.</u></li> </ol>

### b) ALLERGENS

OŚWIADCZENIE O ALERGENACH			
ROZPORZĄDZENIE PARLAMENTU EUROPEJSKIEGO I RADY (UE) NR 1169/2011 z dnia 25 października 2011 r.			
L.p	GŁÓWNE ALERGENY	Product TAK/NIE	Production line TAK/NIE
1.	<b>Zboża zawierające gluten</b> , tj. pszenica, żyto, jęczmień, owies, orkisz, kamut lub ich odmiany hybrydowe, a także produkty pochodne	NIE	NIE
2.	<b>Skorupiaki</b> i produkty pochodne	NIE	NIE
3.	<b>Jaja</b> i produkty pochodne	NIE	NIE
4.	<b>Ryby</b> i produkty pochodne	NIE	NIE
5.	<b>Orzeszki ziemne (arachidowe)</b> i produkty pochodne	NIE	NIE
6.	<b>Soja</b> i produkty pochodne	NIE	NIE
7.	<b>Mleko</b> i produkty pochodne (łącznie z laktozą)	NIE	NIE
8.	<b>Orzechy</b> (tj. migdały, orzechy laskowe, orzechy włoskie, orzechy nerkowca, orzeszki pekan, orzechy brazylijskie, pistacje/orzechy pistacjowe, orzechy makadamia lub orzechy) i produkty pochodne	NIE	NIE
9.	<b>Seler</b> i produkty pochodne	NIE	NIE

 <b>Greenvit</b> <small>SCIENTIFIC EXTRACTS MANUFACTURERS</small> Greenvit Sp. z o.o. Al. Wojska Polskiego 27A 18-300 Zambrów <a href="http://greenvit.pl/">http://greenvit.pl/</a>	<b>SPECYFIKACJA JAKOŚCIOWA</b> <b>QUALITY SPECIFICATION</b>	<b>Nr/No:</b> E109206 <b>Wersja B/ Version B</b> <b>Wydanie: 6/ Issue: 6</b>
	<b>Aronvit® 25% - Suchy ekstrakt z owocu aronii</b> <b>Aronvit® 25% - Aronia berry dry extract</b>	<b>Data wydania/</b> <b>Date of issue:</b> 01.10.2021
	<b><i>Aronia melanocarpa (Michx.) Elliott</i></b>	Strona/Page: 4/5


10.	<b>Gorczyca</b> i produkty pochodne	NIE	NIE
11.	<b>Nasiona sezamu</b> i produkty pochodne	NIE	NIE
12.	<b>Dwutlenek siarki i siarczyny</b> w stężeniach powyżej 10 mg/kg lub 10 mg/l w przeliczeniu na całkowitą zawartość SO <sub>2</sub>	NIE	NIE
13.	<b>Łubin</b> i produkty pochodne	NIE	NIE
14.	<b>Mięczaki</b> i produkty pochodne	NIE	NIE

<b>ALLERGEN STATEMENT</b>			
ACCORDING ANNEX II REG. (EU) 1169/2011 (substances or products causing allergies or intolerances)			
L.p	Allergenic substances	Product YES/NO	Production line YES/NO
1.	<b>Cereals containing gluten</b> (i.e. wheat, rye, barley, oats, spelt, kamut or their hybridised strains) and products thereof	NO	NO
2.	<b>Crustaceans</b> and products thereof	NO	NO
3.	<b>Eggs</b> nad products thereof	NO	NO
4.	<b>Fish</b> and products thereof	NO	NO
5.	<b>Peanuts</b> and products thereof	NO	NO
6.	<b>Soybeans</b> and products thereof	NO	NO
7.	<b>Milk</b> and products thereof (including lactose)	NO	NO
8.	<b>Nuts</b> i.e. almond, hazelnut, walnut, cashew, pecan nut, brazil nut, pistachio nut, macadamia nut and product thereof	NO	NO
9.	<b>Celery</b> and products thereof	NO	NO
10.	<b>Mustard</b> and products thereof	NO	NO
11.	<b>Sesame seeds</b> and products thereof	NO	NO
12.	<b>Sulphur dioxide and sulphites</b> at concentrations of more than 10 mg/kg lub 10 mg/litre expresses as SO <sub>2</sub>	NO	NO
13.	<b>Lupin</b> and products thereof	NO	NO
14.	<b>Mollusc</b> (gastropods, bivalves or cephalopods) and products thereof	NO	NO

**Complementary data:**

We thank you to take note of these documents. Without any news from you within 48 hours after reception, these enclosed documents will be considered as accepted.

**Załącznik nr 2.** Specyfikacja suchego ekstraktu z owoców bzu czarnego, standaryzowanego na minimum 25% antocyjanów.


 <p>Greenvit Sp. z o.o. Al. Wojska Polskiego 27A 18-300 Zambrow <a href="http://greenvit.pl/">http://greenvit.pl/</a></p>	<b>SPECYFIKACJA JAKOŚCIOWA</b> <b>QUALITY SPECIFICATION</b>	<b>Nr/No:</b> E020207 <b>Wersja B/Version B</b> <b>Wydanie: 2/ Issue: 2</b>
	<b>Suchy ekstrakt z owocu bzu czarnego 25%</b> <b>Elderberry fruit dry extract 25%</b>	<b>Data wydania/</b> <b>Date of issue:</b> 26.01.2021
	<i>Sambucus nigra L.</i>	<b>Strona/Page:</b> 1/5

**PRODUKT /PRODUCT: SUCHY EKSTRAKT Z OWOCU BZU CZARNEGO 25%/ Elderberry fruit dry extract 25%**

<b>1. Opis produktu /Main characteristic</b>		
• <b>Wygląd/Appearance</b>	<b>Proszek barwy czarnej/ Black, fine powder</b>	
• <b>Część rośliny/Part of plant used</b>	<b>Owoc/Fruit</b>	
• <b>Rozpuszczalnik ekstrakcyjny/Extraction solvent</b>	Etanol/Ethanol Woda/Water	
• <b>Rozdrobnienie/Mesh</b>	<b>80 mesh</b>	
• <b>Nośnik/Carrier</b>	Maltodekstryna/Maltodextrin	
• <b>Kod produktu/Code number</b>	E020207	
• <b>Kraj produkcji ekstraktu/Country of origin of the extract</b>	<b>Polska/Poland</b>	
<b>2. Charakterystyka fizykochemiczna/Physico-Chemical parameters</b>		
	<b>Metoda/Method</b>	<b>Specyfikacja/Specification</b>
• <b>Strata masy po suszeniu/Loss on drying</b>	FP XI/Ph.Eur.01/2008:20817	<5 % (m/m)
• <b>Zawartość antocyjanów/Anthocyanins content</b>	HPLC	min. 25%
• <b>Zawartość polifenoli/Polyphenols content</b>	UV	Min.37,5%
• <b>*Metale ciężkie/Heavy metals (mg/kg)</b>	PB-68/ICP ed III from 18.09.2012 PB-68/ICP ed III from 18.09.2012 PB-30/CVAAS ed V from 18.09.2012	<b>Olów/Lead:</b> <= 3.0 mg/kg <b>Kadm/Cadmium:</b> <= 1.0 mg/kg <b>Rtęć/Mercury:</b> <= 0.1 mg/kg
• <b>*Aflatoksyna B<sub>1</sub>/Aflatoxin<sub>1</sub> (µg/kg)</b>	PB-30 ed V from 01.02.2019	< 2 µg/kg
• <b>*Σ Aflatoksyn B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>/Aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> (µg/kg)</b>	PB-30 ed V from 01.02.2019	< 4µg/kg
• <b>*Pestycydy/Pesticides</b>	PN-EN 15662:2018-06	<b>Zgodny/Compatible</b>
• <b>*Σ WWA/Σ PAH's (Benzo(a)piren, Benz(a)antracen, Chryzen, Benzo(a)fluoranten (µg/kg)</b>	PB-117/HPLC ed VI from 20.01.2019	<= 50.0µg/kg
• <b>*Benzo(a)piren (µg/kg)</b>	PB-117/HPLC ed VI from 20.01.2019	<= 10.0µg/kg
* - Wg Planu Badań (min.1/rok)/According to the research plan (min.1/year)		
<b>3. Charakterystyka mikrobiologiczna/Microbiological parameters</b>		
	<b>Metoda/Method</b>	<b>Specyfikacja/Specification</b>
• <b>Całkowita liczba drobnoustrojów jtk/g/Bacterial count (CFU/g)</b>	PN-EN ISO 4833-1:2013-12	< 10 <sup>4</sup> jtk/g

**Complementary data:**

We thank you to take note of these documents. Without any news from you within 48 hours after reception, these enclosed documents will be considered as accepted.

 <b>Greenvit</b> <small>BIOLOGICAL EXTRACTS MANUFACTURERS</small> Greenvit Sp. z o.o. Al. Wojska Polskiego 27A 18-300 Zambrów <a href="http://greenvit.pl/">http://greenvit.pl/</a>	<b>SPECYFIKACJA JAKOŚCIOWA</b> <b>QUALITY SPECIFICATION</b>	<b>Nr/No:</b> E020207 <b>Wersja B/ Version B</b> <b>Wydanie: 2/ Issue: 2</b>
	Suchy ekstrakt z owocu bzu czarnego 25% Elderberry fruit dry extract 25%	<b>Data wydania/</b> <b>Date of issue:</b> 26.01.2021
	<i>Sambucus nigra L.</i>	<b>Strona/Page:</b> 2/5


<ul style="list-style-type: none"> <li>• Liczba grzybów (pleśnie i drożdże) jtk/g/Yeasts &amp; Moulds (CFU/g)</li> </ul>	PN-ISO 7954:1999	< 10 <sup>2</sup> jtk/g
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Escherichia coli</i></li> </ul>	PN-ISO 7251:2006	Nieobecna w 1 g/Negative in 1 g
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Salmonella spp.</i></li> </ul>	PN-EN ISO 6579-1:2017-04	Nieobecna w 25 g/Negative in 25 g

<b>4. Warunki przechowywania/Storage conditions</b>		
Przechowywać w temperaturze poniżej 25°C, w szczelnie zamkniętym opakowaniu, z dala od światła słonecznego, wilgoci i źródeł ciepła/Store at temperature below 25°C, in a well closed bag away from moisture and direct sun light		
<b>5. Okres ważności/Shelf life</b>		
24 miesiące pod warunkiem właściwego przechowywania/24 months from the production		
<b>6. Materiał opakowaniowy/Packaging</b>		
Worek 2 x 5 kg (PET12/AL8/PE) zapakowany w kartonowe opakowanie zbiorcze/2 x 5 kg bag (PET12/AL8/PE) packaged in cardboard collective		
<b>7. Znakowanie/Marking</b>		
Dane podane na etykiecie umieszczonej na opakowaniu powinny zawierać/ Adhesive label should be attached to all unit packaging and include:		
- nazwa produktu/product name		
- kod produktu/code number		
- nr partii/batch number		
- data produkcji/production date		
- data minimalnej trwałości/date of minimum durability		
- masa netto/net weight		
- przechowywanie/storage conditions		
- adres Dostawcy/ producer name and address		

**Complementary data:**

We thank you to take note of these documents. Without any news from you within 48 hours after reception, these enclosed documents will be considered as accepted.



 Greenvit Sp. z o.o. Al. Wojska Polskiego 27A 18-300 Zambrow <a href="http://greenvit.pl/">http://greenvit.pl/</a>	<b>SPECYFIKACJA JAKOŚCIOWA</b> <b>QUALITY SPECIFICATION</b>	<b>Nr/No:</b> E020207 <b>Wersja B/ Version B</b> <b>Wydanie: 2/ Issue: 2</b>
	Suchy ekstrakt z owocu bzu czarnego 25% Elderberry fruit dry extract 25%	<b>Data wydania/</b> <b>Date of issue:</b> 26.01.2021
	<i>Sambucus nigra L.</i>	Strona/Page: 3/5

### DODATKOWE WYMAGANIA / ADDITIONAL INFORMATION ABOUT FOOD SAFETY

#### a) GMO


OŚWIADCZENIE O GMO (ORGANIZMACH GENETYCZNIE MODYFIKOWANYCH)	STATEMENT CONCERNING THE USE OF GENETIC ENGINEERING
<p>Po uprzednim sprawdzeniu u naszych Dostawców potwierdzamy w niniejszym oświadczeniu, że składniki użyte do produkcji wyżej wymienionego produktu nie zawierają oraz nie zostały wytworzone z organizmów genetycznie modyfikowanych</p> <p style="text-align: center;">Podstawa prawna:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li><u>Rozporządzenie (WE) nr 1829/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 22 września 2003 r. w sprawie genetycznie zmodyfikowanej żywności i paszy.</u></li> <li><u>Rozporządzenie (WE) nr 1830/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 22 września 2003 r. dotyczące możliwości śledzenia i etykietowania organizmów zmodyfikowanych genetycznie oraz możliwości śledzenia żywności i produktów paszowych wyprodukowanych z organizmów zmodyfikowanych genetycznie i zmieniające dyrektywę 2001/18/WE</u></li> </ol>	<p>The above-mentioned products does not contain GMOs and does not contain GMO labeled raw materials</p> <p style="text-align: center;">Legal base:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li><u>Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed.</u></li> <li><u>Regulation (EC) No 1830/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 concerning the traceability and labeling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive 2001/18/EC.</u></li> </ol>

#### b) ALLERGENS

OŚWIADCZENIE O ALERGENACH			
ROZPORZĄDZENIE PARLAMENTU EUROPEJSKIEGO I RADY (UE) NR 1169/2011 z dnia 25 października 2011 r.			
L.p	GŁÓWNE ALERGENY	Product TAK/NIE	Production line TAK/NIE
1.	<b>Zboża zawierające gluten</b> , tj. pszenica, żyto, jęczmień, owies, orkisz, kamut lub ich odmiany hybrydowe, a także produkty pochodne	NIE	NIE
2.	<b>Skorupiaki</b> i produkty pochodne	NIE	NIE
3.	<b>Jaja</b> i produkty pochodne	NIE	NIE
4.	<b>Ryby</b> i produkty pochodne	NIE	NIE
5.	<b>Orzeszki ziemne (arachidowe)</b> i produkty pochodne	NIE	NIE
6.	<b>Soja</b> i produkty pochodne	NIE	NIE
7.	<b>Mleko</b> i produkty pochodne (łącznie z laktozą)	NIE	NIE
8.	<b>Orzechy</b> (tj. migdały, orzechy laskowe, orzechy włoskie, orzechy nerkowca, orzeszki pekan, orzechy brazylijskie, pistacje/orzechy pistacjowe, orzechy makadamia lub orzechy) i produkty pochodne	NIE	NIE
9.	<b>Seler</b> i produkty pochodne	NIE	NIE

#### Complementary data:

We thank you to take note of these documents. Without any news from you within 48 hours after reception, these enclosed documents will be considered as accepted.

 <b>Greenvit</b> <small>NUTRACON. CONTACTS. MANUFACTURES</small> Greenvit Sp. z o.o. Al. Wojska Polskiego 27A 18-300 Zambrow <a href="http://greenvit.pl/">http://greenvit.pl/</a>	<b>SPECYFIKACJA JAKOŚCIOWA</b> <b>QUALITY SPECIFICATION</b>	<b>Nr/No:</b> E020207 <b>Wersja B/ Version B</b> <b>Wydanie: 2/ Issue: 2</b>
	Suchy ekstrakt z owocu bzu czarnego 25% Elderberry fruit dry extract 25%	<b>Data wydania/</b> <b>Date of issue:</b> 26.01.2021
	<i>Sambucus nigra L.</i>	Strona/Page: 4/5

10.	<b>Gorczyca</b> i produkty pochodne	NIE	NIE
11.	<b>Nasiona sezamu</b> i produkty pochodne	NIE	NIE
12.	<b>Dwutlenek siarki i siarczyny</b> w stężeniach powyżej 10 mg/kg lub 10 mg/l w przeliczeniu na całkowitą zawartość SO <sub>2</sub>	NIE	NIE
13.	<b>Łubin</b> i produkty pochodne	NIE	NIE
14.	<b>Mięczaki</b> i produkty pochodne	NIE	NIE

ALLERGEN STATEMENT			
ACCORDING ANNEX II REG. (EU) 1169/2011 (substances or products causing allergies or intolerances)			
L.p	Allergenic substances	Product YES/NO	Production line YES/NO
1.	<b>Cereals containing gluten</b> (i.e. wheat, rye, barley, oats, spelt, kamut or their hybridised strains) and products thereof	NO	NO
2.	<b>Crustaceans</b> and products thereof	NO	NO
3.	<b>Eggs</b> and products thereof	NO	NO
4.	<b>Fish</b> and products thereof	NO	NO
5.	<b>Peanuts</b> and products thereof	NO	NO
6.	<b>Soybeans</b> and products thereof	NO	NO
7.	<b>Milk</b> and products thereof (including lactose)	NO	NO
8.	<b>Nuts</b> i.e. almond, hazelnut, walnut, cashew, pecan nut, brazil nut, pistachio nut, macadamia nut and product thereof	NO	NO
9.	<b>Celery</b> and products thereof	NO	NO
10.	<b>Mustard</b> and products thereof	NO	NO
11.	<b>Sesame seeds</b> and products thereof	NO	NO
12.	<b>Sulphur dioxide and sulphites</b> at concentrations of more than 10 mg/kg lub 10 mg/litre expressed as SO <sub>2</sub>	NO	NO
13.	<b>Lupin</b> and products thereof	NO	NO
14.	<b>Mollusc</b> (gastropods, bivalves or cephalopods) and products thereof	NO	NO

**Complementary data:**

We thank you to take note of these documents. Without any news from you within 48 hours after reception, these enclosed documents will be considered as accepted.

## XI. DOROBEK NAUKOWY

### Podsumowanie

Publikacje w czasopismach z listy JCR - 4

Sumaryczny IF=12,461

Punktacja MNiE=410

Cytowania ogółem CI=21 (bez autocytowań – wg bazy Scopus)

Patenty przyznane - 1

Złożone zgłoszenia patentowe – 2

Konferencje: Ogółem - 4,

Komunikaty ustne – 2,

Postery – 2

Projekty: Ogółem – 3,

Wykonawca – 2,

Kierownik projektu – 1

### Publikacje:

1. **M. Banach**, B. Khaidakov, D. Korewo, M. Węsierska, W. Cyplik, J. Kujawa, L. M. Ahrné, W. Kujawski. The Chemical and Cytotoxic Properties of Sambucus nigra Extracts—A Natural Food Colorant. *Sustainability*, 13 (2021) 12702. DOI: 10.3390/su132212702; IF= 3,251; CI=0.
2. **M. Banach**, M. Wiloch, K. Zawada, W. Cyplik, W. Kujawski. Evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activity of anthocyanin-rich water soluble aronia dry extracts. *Molecules*, 25 (2020) 4055; DOI: 10.3390/molecules25184055, IF=4,412; CI=6.
3. M. Wujak, **M. Banach**, D. Porowińska, K. Piskulak, M. Komoszyński. Isolation and bioinformatic analysis of seven genes encoding potato apyrase. Bacterial overexpression, refolding and initial kinetic studies on some recombinant potato apyrase. *Phytochemistry* 93 (2013) 8–17; DOI: 10.1016/j.phytochem.2013.03.014; IF= 3,350; CI=5.
4. A. Kozakiewicz, P. Neumann, **M. Banach**, M. Komoszyński, A. Wojtczak. Modeling studies of potato nucleoside triphosphate diphosphohydrolase NTPDase1: an insight into the catalytic mechanism. *Acta Biochim Pol.* 55 (2008); 141-50, DOI: 10.3390/ijms22063283; IF= 1,448; CI=11.

### **Patenty przyznane:**

1. M. Banach, H. Różański, Rozpuszczalnik ekstrahujący stosowany do ekstrakcji produktów roślinnych wybranych z grupy wierzba *Salix* spp., borówka *Vaccinum myrtillus* L., czarna malwa *Alcea rosea* oraz sposób ekstrakcji. Patent numer 234212. [ewyszukiwarka.pue.uprp.gov.pl/search/pwp-details/P.421485](http://ewyszukiwarka.pue.uprp.gov.pl/search/pwp-details/P.421485)

### **Zgłoszenia patentowe:**

1. Greenvit Sp. z o. o., W. Cyplik, M. Banach; A. Banaś, I. Wawer, Zgłoszenie numer: P.434023, Sposób otrzymywania suchego ekstraktu z melisy, Biuletyn Urzędu Patentowego nr 3/2021
2. Greenvit Sp. z o. o., W. Cyplik, M. Banach, A. Banaś, I. Wawer, Zgłoszenie numer: P.434022 Rozpuszczalnik ekstrahujący do otrzymywania suchego ekstraktu z aronii oraz sposób wytwarzania suchego ekstraktu z owoców lub wyłoków aronii, Biuletyn Urzędu Patentowego nr 3/2021

### **Konferencje:**

1. **M. Banach**, K. Zawada, Właściwości przeciwutleniające ekstraktów z aronii, VIII Zielarska Konferencja Kobiet, Koryciny, 28-30.06.2019, poster.
2. **M. Banach**, A. Zielińska, W. Cyplik, W. Kujawski, A. Kucharska, Aronia czarnoowocowa i jej wykorzystanie. Innowacyjny ekstrakt antocyjanów, VI konferencja „Rośliny zielarskie, kosmetyki naturalne i żywność funkcjonalna”; Krosno, 9-10.05.2019, prezentacja ustna.
3. **M. Banach**, Purification of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* berries, V International Conference on Methods and Materials for Separation Processes, Kudowa Zdrój, 27-30.08.2018, poster.
4. **M. Banach**, Optymalizacja procesu wytwarzania suchego ekstraktu z kory wierzby standaryzowanego na zawartość salicyny, VI Konferencja Zielarska Kobiet, Koryciny, 23-25.06.2017, prezentacja ustna.

### **Projekty/granty**

1. Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, POIR.01.01.01-00-1206/20 „Naturalne wsparcie układu odpornościowego organizmu jako sposób prewencji skutków działania wirusa Sars-CoV-2”, Okres realizacji: 10.2020 - 06.2023. Wykonawca grantu.

2. Grant młodych naukowców nr 2020/2301, Wydział Chemii UMK, Wykorzystanie i optymalizacja zaawansowanych technik rozdzielczych do pozyskiwania i zatężania antocyjanów, jako składnika żywności funkcjonalnej. Okres realizacji: 07.2020 - 02.2021. Kierownik grantu.
3. Program Operacyjny Polska Wschodnia 2014-2020, Dywersyfikacja działalności Greenvit Sp. z o.o. poprzez wdrożenie nowych standaryzowanych ekstraktów roślinnych produkowanych w oparciu o innowacyjne technologie Nr projektu: POPW.01.03.01-20-0008/17. Okres realizacji: 09.2017 - 06.2020. Wykonawca grantu.