



MD 4470 C1 2017.10.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4470** (13) **C1**
(51) Int.Cl: *A61K 36/52* (2006.01)
A61K 38/54 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: a 2016 0035 (22) Data depozit: 2016.03.25	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2017.03.31, BOPI nr. 3/2017
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	
(72) Inventatori: RUDIC Valeriu, MD; BOGDAN Valeriu, MD; CEPOI Liliana, MD; RUDI Liudmila, MD; CHIRIAC Tatiana, MD; GHINDA Serghei, MD; DANILOV Lucian, MD	
(73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

(54) Procedeu de obținere a substanțelor bioactive din coji de nuci mature
(*Juglans regia* L.)

(57) Rezumat:

Invenția se referă la domeniul biotehnologiei, în special la obținerea substanțelor bioactive din coji de nuci mature cu proprietăți antioxidante și imunomodulatoare.

Procedeu de obținere a substanțelor bioactive din coji de nuci mature (*Juglans regia* L.) include fărâmițarea cojilor de nuci mature, macerarea lor timp de 11...13 ore în soluție de enzime pectolitice de 1% la

temperatura de 18...25°C, spălarea prin agitare cu apă a cojilor de nuci pentru eliminarea restului de enzime, amestecarea cojilor de nuci macerate cu soluție hidro-etanolică de 50...55% și extragerea timp de 10...12 ore la temperatura de 18...20°C cu filtrarea ulterioară a extractului hidro-etanolic obținut.

Revendicări: 1

MD 4470 C1 2017.10.31

**(54) Process for producing bioactive substances from mature walnut shells
(*Juglans regia* L.)**

(57) Abstract:

1
The invention relates to the field of biotechnology, in particular to the production of bioactive substances from mature walnut shells with antioxidant and immunomodulatory properties.

The process for producing bioactive substances from mature walnut shells (*Juglans regia* L.) comprises grinding of mature walnut shells, their maceration for 11...13 hours in a 1% solution of pectolytic enzymes at a

2
temperature of 18...25°C, washing with water by stirring of walnut shells to remove the remaining enzyme, mixing of macerated walnut shells with 50...55% water-ethanol solution and extraction for 10...12 hours at a temperature of 18...20°C with subsequent filtration of the produced water-ethanol extract.

Claims: 1

(54) Способ получения биоактивных веществ из кожуры зрелых грецких орехов (*Juglans regia* L.)

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к области биотехнологии, в частности к получению биоактивных веществ из кожуры зрелых грецких орехов с антиоксидантными и иммуномодулирующими свойствами.

Способ получения биоактивных веществ из кожуры зрелых грецких орехов (*Juglans regia* L.) включает измельчение кожуры зрелых грецких орехов, их мацерацию в течение 11...13 часов в 1%-ном растворе пектолитических ферментов при

2
температуре 18...25°C, водную промывку путем перемешивания кожуры грецких орехов для удаления оставшегося фермента, смешивание мацерированной кожуры грецких орехов 50...55%-ым водно-этаноловым раствором и экстракцию в течение 10...12 часов при температуре 18...20°C с последующей фильтрацией полученного водно-этанолового экстракта.

П. формулы: 1

Descriere:

Invenția se referă la domeniul biotehnologiei, în special la obținerea substanțelor bioactive din coji de nuci mature cu proprietăți antioxidante și imunomodulatoare.

5 Cea mai apropiată soluție este procedeul de obținere a extractului antioxidant din pulbere de coji de nuci prin extragere cu utilizarea alcoolului etilic în calitate de solvent la temperatura de 50°C timp de 60 min. Activitatea antioxidantă a extractului standardizat (10 mg/ml) este de 263,06 EC₅₀(μg) DPPH [1].

10 Dezavantajul acestui procedeu constă în activitatea antioxidantă redusă a extractului.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui procedeu eficient și reproductibil de obținere a produsului cu proprietăți antioxidante pe bază de coji de nuci mature.

15 Procedeul de obținere a substanțelor bioactive din coji de nuci mature (*Juglans regia* L.), conform invenției, înlătură dezavantajul menționat mai sus prin aceea că include fărâmițarea cojilor de nuci mature, macerarea lor timp de 11...13 ore în soluție de enzime pectolitice de 1% la temperatura de 18...25°C, spălarea prin agitare cu apă a cojilor de nuci pentru eliminarea restului de enzime, amestecarea cojilor de nuci macerate cu soluție hidro-etanolică de 50...55% și extragerea timp de 10...12 ore la temperatura de 18...20°C cu filtrarea ulterioară a extractului hidro-etanolic obținut.

20 Rezultatul tehnic al invenției constă în sporirea activității antioxidante a extractului etanolic din coji de nuci de 4,3...4,4 ori față de cea mai apropiată soluție prin aplicarea etapei de macerare a cojilor cu enzime pectolitice și a utilizării alcoolului etilic de 50...55% pentru extragerea componentelor active.

25 Procedeul de obținere a substanțelor bioactive din coji de nuci mature (*Juglans regia* L.) include fărâmițarea cojilor de nuci mature, macerarea lor timp de 11...13 ore în soluție de enzime pectolitice de 1% la temperatura de 18...25°C, spălarea prin agitare cu apă a cojilor de nuci pentru eliminarea restului de enzime, amestecarea cojilor de nuci macerate cu soluție hidro-etanolică de 50...55% și extragerea timp de 10...12 ore la temperatura de 18...20°C cu filtrarea ulterioară a extractului hidro-etanolic obținut.

30 Exemple de obținere a preparatului antioxidant din coji de nuci mature
Exemplul 1

35 Se fărâmițează 20 g de coji de nuci mature. La masa obținută se adaugă 200 ml soluție de 1% de enzime pectolitice (Zimoclaire CG). Apoi are loc macerarea cojilor la temperatura de 18...20°C timp de 12 ore într-un vas cu capac. După macerare, cojile se spală prin agitare cu apă pentru a elimina restul de enzime. La cojile macerate de nuci se adaugă 200 ml de alcool etilic de 50%. Extragerea are loc la temperatura de 18...20°C timp de 10 ore într-un vas cu capac. Extractul hidro-etanolic obținut se separă de biomasă și se filtrează prin hârtie de filtru. Activitatea antioxidantă se determină prin metoda radicalului DPPH.

40 Extractul obținut din coji de nuci mature are activitatea antioxidantă de 60,05 EC₅₀(μg) DPPH, față de 263,06 EC₅₀(μg) DPPH în cazul celei mai apropiate soluții. Sporul activității antioxidante este de 4,4 ori.

45 Preparatul obținut posedă activitate imunomodulatoare. Testele au fost efectuate în Laboratorul Imunologie și Alergologie la Institutul de Ftiziopulmonologie „Chiril Draganiuc”. Acțiunea *in vitro* a preparatului din coji de nuci asupra activității fagocitare a neutrofilelor (AFN) a fost stabilită în baza datelor testului NBT (tetrazoliu-nitro-blue) și s-a constatat că preparatul dat nu modulează datele testului NBT apropiate de nivelurile persoanelor sănătoase. Asupra nivelurilor inițial scăzute ale testului NBT, comparativ cu cele ale persoanelor sănătoase, preparatul testat acordă o acțiune stimulatorie, iar asupra nivelurilor inițial înalte, comparativ cu persoanele sănătoase, exercită un efect de depreciere a acestora.

50 Analiza acțiunii preparatului din coji de nuci asupra nivelurilor indicelui fagocitar (IF) a arătat că preparatul nu a modulat nivelurile IF apropiate de cele ale subiecților sănătoși. Asupra nivelurilor IF mai scăzute față de nivelurile persoanelor sănătoase, exercită un efect stimulator, iar asupra indicilor mai crescuți de nivelurile persoanelor sănătoase preparatul acordă un efect supresiv.

Acțiunea *in vitro* a preparatului din coji de nuci asupra conținutului neutrofilelor fagocitare (după nivelurile numărului fagocitar - NF) este stimulatorie în cazul valorilor joase ale NF și depresiv în cazul valorilor crescute ale NF.

Exemplul 2

5 Se fărâmițează 20 g de coji de nuci mature. La masa obținută se adaugă 200 ml soluție de 1% de enzime pectolitice (Zimoclaire CG). Apoi are loc macerarea cojilor la temperatura de 20°C timp de 12 ore într-un vas cu capac. După macerare, cojile se spală prin agitare cu apă pentru a elimina restul de enzime. La cojile macerate de nuci se adaugă 200 ml de alcool etilic de 55%. Extragerea are loc la temperatura de 20°C timp
10 de 12 ore într-un vas cu capac. Extractul hidro-etanolic obținut se separă de biomasă și se filtrează prin hârtie de filtru. Activitatea antioxidantă se determină prin metoda radicalului DPPH.

15 Extractul etanolic din coji de nuci mature are activitatea antioxidantă de 61 EC₅₀(μg) DPPH, față de 263,06 EC₅₀(μg) DPPH în cazul celei mai apropiate soluții. Sporul activității antioxidante este de 4,3 ori.

20 Preparatul obținut posedă activitate imunomodulatoare. Testele au fost efectuate în Laboratorul Imunologie și Alergologie la Institutul de Ftiziopulmonologie „Chiril Draganiuc”. Acțiunea *in vitro* a preparatului din coji de nuci asupra activității fagocitare a neutrofilelor (AFN) a fost stabilită în baza datelor testului NBT (tetrazoliu-nitro-blue) și s-a constatat că preparatul dat nu modulează datele testului NBT apropiate de nivelurile persoanelor sănătoase. Asupra nivelurilor inițial scăzute ale testului NBT, comparativ cu cele ale persoanelor sănătoase, preparatul testat acordă o acțiune stimulatorie, iar asupra nivelurilor inițial înalte, comparativ cu persoanele sănătoase, exercită un efect de depreciere a acestora.

25 Analiza acțiunii preparatului din coji de nuci asupra nivelurilor indicelui fagocitar (IF) a arătat că preparatul nu a modulat nivelurile IF apropiate de cele ale subiecților sănătoși. Asupra nivelurilor IF mai scăzute față de nivelurile persoanelor sănătoase, exercită un efect stimulator, iar asupra indicilor mai crescuți de nivelurile persoanelor sănătoase preparatul acordă un efect supresiv.

30 Acțiunea *in vitro* a preparatului din coji de nuci asupra conținutului neutrofilelor fagocitare (după nivelurile numărului fagocitar - NF) este stimulatorie în cazul valorilor joase ale NF și depresiv în cazul valorilor crescute ale NF.

Exemplul 3

35 Se fărâmițează 20 g de coji de nuci mature. La masa obținută se adaugă 200 ml soluție de 1% de enzime pectolitice (Zimoclaire CG). Apoi are loc macerarea cojilor la temperatura de 18...20°C timp de 12 ore într-un vas cu capac. După macerare, cojile se spală prin agitare cu apă pentru a elimina restul de enzime. La cojile macerate de nuci se adaugă 200 ml de alcool etilic de 40%. Extragerea are loc la temperatura de 18...20°C timp de 10 ore într-un vas cu capac. Extractul hidro-etanolic obținut se separă de
40 biomasă și se filtrează prin hârtie de filtru. Activitatea antioxidantă se determină prin metoda radicalului DPPH.

45 Preparatul obținut din coji de nuci mature are activitatea antioxidantă de 120,11 EC₅₀(μg) DPPH, față de 263,06 EC₅₀(μg) DPPH în cazul celei mai apropiate soluții. Sporul activității antioxidante este de 2,2 ori.

Exemplul 4

50 Se fărâmițează 20 g de coji de nuci mature. La masa obținută se adaugă 200 ml soluție de 1% de enzime pectolitice (Zimoclaire CG). Apoi are loc macerarea cojilor la temperatura de 18...20°C timp de 12 ore într-un vas cu capac. După macerare, cojile se spală prin agitare cu apă pentru a elimina restul de enzime. La cojile macerate de nuci se adaugă 200 ml de alcool etilic de 60%. Extragerea are loc la temperatura de 18...20°C timp de 10 ore într-un vas cu capac. Extractul hidro-etanolic obținut se separă de
55 biomasă și se filtrează prin hârtie de filtru. Activitatea antioxidantă se determină prin metoda radicalului DPPH.

Preparatul obținut din coji de nuci mature are activitatea antioxidantă de 133,0 EC₅₀(μg) DPPH, față de 263,06 EC₅₀(μg) DPPH în cazul celei mai apropiate soluții. Sporul activității antioxidante este de 2 ori.

(56) Referințe bibliografice citate in descriere:

1. Jiong Yang, Chaoyin Chen, Shenglan Zhao, Feng Ge, Diqiu Liu. Effect of Solvents on the Antioxidant Activity of Walnut (*Juglans regia* L.) Shell Extracts. Jurnal of Food and Nutrition Research, 2014, 2(9), p. 621-626

(57) Revendicări:

Procedeu de obținere a substanțelor bioactive din coji de nuci mature (*Juglans regia* L.), care include fărâmițarea cojilor de nuci mature, macerarea lor timp de 11...13 ore în soluție de enzime pectolitice de 1% la temperatura de 18...25°C, spălarea prin agitare cu apă a cojilor de nuci pentru eliminarea restului de enzime, amestecarea cojilor de nuci macerate cu soluție hidro-etanolică de 50...55% și extragerea timp de 10...12 ore la temperatura de 18...20°C cu filtrarea ulterioară a extractului hidro-etanolic obținut.

Șef Direcție Brevete:

IUSTIN Viorel

Șef Secție Examinare:

LEVIȚCHI Svetlana

Examinator:

GROSU Viorel