



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2021 00110**

(22) Data de depozit: **11/03/2021**

(41) Data publicării cererii:
30/08/2021 BOPI nr. **8/2021**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
CHIMIE ȘI PETROCHIMIE - ICECHIM,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**

• **CONSTANTINESCU- ARUXANDEI DIANA,
ȘOS.MIHAI BRAVU NR.297, BL.15A, SC.A,
AP.5, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **BALA IOANA, STR.POIANA CU ALUNI,
NR.1, BL.4, SC.4, ET.4, AP.60, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **DIMITRIU LUMINIȚA, ALEEA BARAJULUI
BICAZ, NR.9, BL.M31, SC.B, ET.2, AP.408,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **EXTRACT VEGETAL SINERGIC ȘI PROCEDEU DE OBȚINERE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unei compoziții de extract vegetal sinergic utilizat pentru realizarea de suplimente nutritive. Procedeu, conform invenției, constă în etapele de: măcinare umedă a materialului vegetal ales dintre pulpă de cătină din care s-a extras uleiul, pulpă de afine sau mure din care s-a extras sucul și boască de struguri, determinarea activității antioxidante de captare a radicalului 2,2-difenil-1-picrililhidrazil (DPPH), față de care se dozează un amestec de enzime de extracție format din pectinază și feruoil-esterază, ultrasonicare repetată a substratului vegetal cu enzime, urmată de extracția sub-critică în

contra-curent, separarea materialului vegetal de extractul alcoolic și concentrarea până la 35% substanță uscată cu recuperarea etanolului, din care rezultă un extract având un conținut minim de 2,7 g resveratrol, 12,2 g acizi hidroxicinamici totali și 18,3 g oligozaharide pectice la 100 ml extract etanolic concentrat și o activitate antioxidantă de captare a radicalului DPPH de cel puțin 3,5 mg echivalent Trolox per g extract.

Revendicări: 4



EXTRACT VEGETAL SINERGIC ȘI PROCEDEU DE OBTINERE

Prezenta invenție se referă la o compoziție de extract vegetal sinergic, pe bază de acid ferulic și/sau acizi hidroxicinamici înrudiți, resveratrol și oligozaharide pectice, destinat utilizării pentru realizarea de suplimente nutritive / nutraceutice și produse cosmetice / cosmeceutice, și la un procedeu de obținere a acestei compoziții.

Sunt cunoscute diferite compoziții sinergice pe bază de acid ferulic și/sau acizi hidroxicinamici înrudiți și resveratrol și, eventual, alte ingrediente. Brevetul KR 102182794 B1 prezintă o metodă de obținere a unei compoziții de resveratrol și acid ferulic acid prin emulsifiere ultrasonică și injecție de gaz sub presiune. Brevetul EP 2906037 (B1) revendică o compoziție antioxidantă sinergică formată dintr-un flavonoid, selectat din grupul constând din baicalină și taxifolin, acid ferulic și cel puțin un antioxidant suplimentar selectat din grupul constând din vitamina C și resveratrol, destinată utilizării în produse cosmetice. Cererea de brevet WO2020104533A1 se referă la utilizarea unei compoziții care include compuși bioactivi extrași din *Vitis vinifera* și *Vaccinium angustifolium*, amestecul cuprinzând: cel puțin 1% catehine și / sau epicatechine, procentul fiind at din greutate raportat la greutatea totală a amestecul; cel puțin 5 ppm (părți per milion în amestec) de acid ferulic și cel puțin 200 ppm de resveratrol, ca doză unică la oameni sau animale, pentru a îmbunătăți sau a menține funcțiile cognitive.

În general compozițiile sunt obținute prin extragerea diferitelor substrate vegetale, purificarea avansată a ingredientelor și apoi recombinația lor în diferite proporții. De exemplu acidul ferulic și/sau acizii hidroxicinamici înrudiți, una din componentele compozițiilor sinergice care conțin și resveratrol, este extras din diferite substrate vegetale. Cererea de brevet WO2021011810 A1 prezintă un proces pentru extracția reactivă și purificarea ulterioară a moleculelor organice din biomasă, care include extragerea unuia sau mai multor produse din biomasă folosind un solvent de extracție pentru a solvata produsele, contactarea biomasei cu un reactant în timpul extragerii, recuperarea unuia sau mai multor produse, efectuarea ultrafiltrare pentru îndepărtarea impurităților din unul sau mai multe produse pentru a produce un extract filtrat, extragerea uleiurilor din extractul filtrat folosind adsorbția pentru a produce un extract degresat, efectuarea trans-esterificării sau hidrolizei extractului degresat și efectuarea purificării prin adsorbție a acidului ferulic, acidului cumarinic, ferulului sau cumaratului sau o combinație a acestora.



Brevetul EP2999687 B1 descrie un procedeu de extracție a acidului ferulic prezent într-o fază apoasă, obținut prin tratarea a cel puțin unui material vegetal și care conține, de asemenea, polizaharide, procesul menționat cuprinzând cel puțin următoarele etape: 1) tratamentul respectivului material vegetal urmat de o separare solid / lichid pentru a recupera o fază solidă și o fază lichidă apoasă cuprinzând acidul ferulic și respectivele polizaharide, 2) tratamentul fazei lichide menționate pentru a separa selectiv, pe de o parte, polizaharidele și, pe de altă parte, acid ferulic prezent într-o fracție apoasă, 3) concentrația fracției apoase menționate care conține acidul ferulic astfel încât să recupereze un flux concentrat de acid ferulic, 4) recuperarea acidului ferulic sub formă solidă.

Resveratrolul este extras tot din material vegetal, ca de ex. rădăcină de iulișcă (*Reynoutria japonica*, sinonime *Fallopia japonica* și *Polygonum cuspidatum*), coajă și sâmburii de struguri (*Vitis vinifera* L) fructe de afine (*Vaccinium myrtillus*), merișor (*Vaccinium vitis idaea*) mure (*Rubus hirtus*). Brevetul CN 102320934 descrie o metodă de extracție a resveratrolului din *Reynoutria japonica*, prin extracție cu amestec de solvenți apă: etanol (metanol) la un raport materie primă: solvent de 1:8-1:20 (m/v). Extracția se realizează în 3 trepte, timp de 1-2h la temperatura de 50°C-85°C. Extractul concentrat, prin îndepărtarea solventului prin distilare la vid și se supune hidrolizei acide, timp de 3 h la 50°C-80°C. Peste amestecul hidrolizat răcit, se adaugă soluție alcalină până la pH neutru. Se precipită resveratrol de puritate între 50,5-52,3%.

Brevetul CN1724495 prezintă un procedeu de extracție asistat de ultrasunete, folosind ca și solvent de extracție etanol, urmată de recuperarea resveratrolului printr-o a doua extracție în acetat de etil. Separarea resveratrolului se realizează prin metoda cromatografică, folosind ca și fază staționară o coloană cu umplutură de celuloză.

Brevetul CN102070410/ revendică un procedeu enzimatic combinat cu microunde pentru extragerea resveratrolului din *Reynoutria japonica*. Procedeu implică utilizarea unei soluții de 80% etanol ca solvent de extracție, într-un raport masic solvent-material de 20:1, adăugarea a 10 mg de celulază pentru extracție enzimatică la temperatura de 50°C și valoarea pH-ului 5, timp de 30 de minute, prin tratare cu microunde.

Cererea de brevet RO133170 A2 se referă la un procedeu de preparare a unui concentrat de polifenol cu trans-resveratrol ca principală componentă activă. Conform invenției, procesul constă în faptul că subproduse de tip boască de struguri / rădăcină, sunt supuse unor etape de extracție fizico-chimică și enzimatică în prezența unor β glucozidaze depuse pe particulele magnetice, la temperaturi de 40 ... 45°C, pH 5



perioada de hidroliză 12 ... 24 h, urmată de o extracție alcoolică la reflux timp de 1 oră la 70 ... 80 ° C, rezultând un extract polifenolic total, cu o eficiență a extracției ca polifenoli de 67%, cu o concentrație de resveratrol de minimum 90%.

Dezavantajul acestor procedee care urmăresc purificarea componentelor și apoi recombinația lor este dat de faptul că distrug sisteme complexe în încercarea de a le reconstitui. Un produs complex este mai mult decât suma părților sale componente, datorită caracteristicilor emergente, adică "comportamente neașteptate care rezultă din interacțiunea dintre componentele unei aplicații și mediul lor" (Johnson, 2006). Cea mai cunoscută proprietate emergentă este sinergia, adică îmbunătățirea reciprocă a activităților biologice ale diferitelor ingrediente biologice active. În general, componentele extrase sunt mai active în combinațiile lor naturale față de compușii extrași.. A fost demonstrat de exemplu faptul că resveratrolul, în combinația sa naturală din strugurii întregi, este mai eficient în promovarea sănătății și gestionarea bolilor (C. K. Singh, Liu, & Ahmad, 2015).

Acizii hidroxicinnamici au atât o semnificație cosmeceutică (Taofiq, González-Paramás, Barreiro, & Ferreira, 2017), cât și o semnificația nutraceutică (Silva & Batista, 2017). Semnificația lor cosmeceutică rezultă din activitățile lor anti-tirozinaza, anti-colagenază, anti-hialuronidază, fotoprotectoare, antioxidantă, anti-inflamatorie și antimicrobiană (Neelam, Khatkar, & Sharma, 2019; Taofiq et al., 2017). Efectele nutraceutice sunt legate de activitățile lor antioxidant (Razzaghi-Asl, Garrido, Khazraei, Borges, & Firuzi, 2013), anti-inflammatory (Ghosh, Basak, Dutta, Chowdhury, & Sil, 2017), anti-diabetice (Vinayagam, Jayachandran, & Xu, 2016), anti-hypertensive (Alam, 2019), neuroprotective (Szwajgier, Borowiec, & Pustelniak, 2017) și prebiotice (Coman & Vodnar, 2019). În pofida activităților lor biologice dovedite, acizii hidroxicinnamici sunt sub-utilizați în industriile cosmetice și a suplimentelor nutritive, fiind depuse un număr limitat de cereri de brevete legate de utilizarea acizilor hidroxicinnamici și a derivaților acestora în aceste domenii (Chaudhary et al., 2019; Cunha et al., 2019).

În plante, principalul rol al acizilor hidroxicinnamici este de ancora componentele hidrofobe ale matricei extracelulare lignocelulozice / pereților celulari (lignina) de cele hidofile – hemicelulozele (de Oliveira et al., 2015). Datorită acestui rol de ancoră a matricei lignocelulozice, acizii hidroxicinnamici esterificați de hemiceluloză reduc accesibilitatea pentru extracția altor compuși din material vegetal. Tratamentele cu enzime specifice care acționează asupra peretelui celular al plantelor cresc accesibilitatea și extractabilitatea atât a acizilor hidroxicinnamici (Mathey & Ibrahim, 2004), cât și a altor compuși biologic activi (Zhang, Liu, Hu, & Yang 2018). Sunt



cunoscute mai multe procedee axate pe utilizarea feruloil-esterazei, împreună cu alte enzime care acționează asupra pereților celulelor plantelor, ca un instrument pentru a îmbunătăți recuperarea acizilor hidroxicinamici din fluxurile laterale agro-industriale din bioeconomie – care au fost recent trecute în revistă (Radenkovs, Juhnevic-Radenkova, Górnaś, & Seglina, 2018).

Studiile recente au demonstrat existența unor interacții sinergice între acizii hidroxicinamici și oligo/ polizaharidele cu care ei sunt natural asociați. Acizii hidroxicinamici sunt recunoscuți pentru activitățile lor antioxidante (Cory, Passarelli, Szeto, Tamez, & Mattei, 2018). În ultimele decenii, s-au acumulat dovezi care au sondează efectele antioxidante ale oligo/polizaharidelor (Yu, Shen, Song, & Xie, 2018). Oligo/polizaharidele nedigerabile de enzimele sistemului digestiv al animalelor (de obicei cele asociate cu peretele celular al plantei) sunt bine cunoscute pentru efectele lor prebiotice, stimulând dezvoltarea microorganismelor benefice ale sistemului digestiv (Al-Sheraji et al., 2013). Polifenolii au fost incluși recent printre prebioticele de nouă generație (Gibson et al., 2017), datorită efectelor de protecție și de stimulare a respirației la nivel celular. Autorii au demonstrat existența unor interacții sinergice între acidul ferulic / acizii hidroxicinamici și oligozaharidele pectice. Au fost recent demonstrate funcțiile oligozaharidelor pectice ca prebiotice (R. P. Singh et al., 2020) și antioxidante (Sabater, Blanco-Doval, Montilla, & Corzo, 2021).

Unul dintre dezavantajele diferitelor substrate vegetale utilizate ca sursă de acid ferulic/ acizi hidroxicinamici, resveratrol și oligozaharide, este dată de variabilitatea lor compozițională, datorită variabilității biologice combinată cu cea a condițiilor pedoclimatice. Din acest motiv s-a preferat separarea componentelor biologice active și apoi recombinația lor.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a obține o compoziție de extract vegetal sinergic, pe bază de acid ferulic și/sau acizi hidroxicinamici înrudiți, resveratrol și oligozaharide pectice, printr-un procedeu care să nu implice separarea compușilor, purificarea lor avansată și apoi recombinația lor, dar care să asigure reproductibilitatea activității lor.

Compoziția de extract vegetal sinergic conține minimum 2,7 grame de resveratrol, 12,2 grame de acizi hidroxicinamici totali și 18,3 grame oligozaharide pectice la 100 ml extract etanolic concentrat și are o activitate antioxidantă de captare a radicalului DPPH, 2,2-difenil-1-picrililhidrazil, de cel puțin 3,5 mg echivalenți Trolox per g extract.



Procedeul de obținere a compoziției de mai sus este alcătuit din următoarele etape:

- ✓ Măcinarea umedă a materialului vegetal până la dimensiuni de 0,5 mm;
- ✓ Extracția unei probe umede de 10-15 grame din materialului vegetal supus extracției, prin refluxare la Soxhlet timp de 8 ore și determinarea activității anti-oxidante de captare a radicalului DPPH, 2,2-difenil-1-picrililhidrazil;
- ✓ Efectuarea unui spectru Raman 532 nm și stabilirea relațiilor de proporționalitate între picurile de la $1580-1610\text{ cm}^{-1}$ și activitatea antioxidantă de captare a radicalului DPPH;
- ✓ Adăugarea peste materialul vegetal suspendat în raport de un kg la 10 kg apă, a unui amestec de enzime, alcătuit din hidrolaze care acționează asupra polizaharidelor din peretele celular și feruoil-esteraze, urmată de extragerea asistată enzimatic a materialului vegetal în apă, timp de 5 ore la temperatura de $55-60^{\circ}\text{C}$ și pH 6.0;
- ✓ Ultrasonicarea repetată, câte 3 min la fiecare 30 min, cu o putere de 400 W, a substratului vegetal cu enzime;
- ✓ Aducerea peste materialul vegetal suspendat de etanol 96%, în raport de 6 kg etanol 96% la 4 kg suspensie apoasă și extracția în contracurent solid-lichid pe un extractor de fluide subcritic, operat la 8 bari, la temperatura de 45°C , timp de 3 ore;
- ✓ Separarea materialului vegetal de extractul alcoolic prin filtrare pe filtru cu plăci;
- ✓ Concentrarea extractului etanolic, până la 35% substanță uscată, cu recuperarea etanolului;
- ✓ Repetarea etapelor de mai sus de câte ori este nevoie pe același tip de substrat vegetal, pornind de la efectuarea unui spectru Raman, pentru a efectua un control rapid preventiv, care să permită dozarea enzimelor de extracție în funcție de activitatea antioxidantă a substratului.

În cadrul procesului de mai sus detaliile specifice sunt următoarele.

Materialul vegetal utilizat în cadrul procedurii conform invenției este pulpă de cătină din care s-a extras uleiul, pulpă de fructe de pădure, ca de ex. afinele sau murele din care s-a extras sucul, boască de struguri.

Amestecul de enzime care acționează asupra polizaharidelor din peretele celular și feruoil-esteraze este alcătuit din pectinază și β -glucanaze, dozate ca 5 unități pectinazice și de 2 unități unități feruoil-esterazice la o activitatea antioxidantă de 1 mg echivalent Trolox în substratului supus extracției.

Prezenta invenție prezintă următoarele avantaje:



Andri

- ✓ Eliberează cantități semnificative de acid ferulic / acizi hidroxicinamici din materialul vegetal, și de oligozaharide pectice, ca urmare a activității specifice a amestecului de enzime;
- ✓ Extrage și concentrează ingredientele active care acționează sinergic fără a mai fi nevoie de separarea compușilor, purificarea lor avansată și apoi recombinarea lor;
- ✓ Permite separarea completă și rapidă a materialului vegetal extras și a enzimelor folosite pentru extracție;

În continuare se prezintă exemple de realizare care ilustrează invenția fără a o limita.

Exemplul 1. Pulpă de cătină din care s-a extras uleiul este măcinat pe o moară cu cuțite (Willey model 4, Thomas, Thermo Fischer, Waltham, MA, SUA), prevăzută cu o sită de 0,5 mm. Se extrage o probă umedă de 10 grame din materialului vegetal supus extracției, prin refluxare la Soxhlet timp de 8 ore. În extract se determină activitatea anti-oxidantă de captare a radicalului DPPH, 2,2-difenil-1-picrilhidrazil printr-o metodă cunoscută (Sharma & Bhat, 2009) și se exprimă ca echivalent Trolox per g extract. Se efectuează un spectru Raman 532 nm (pe un sistem Raman-532, Stellarnet, Tampa, FL, SUA) și se stabilesc relațiile de proporționalitate între picurile de la 1580 cm^{-1} și activitatea antioxidantă de captare a radicalului DPPH.

100 g de pulpă de cătină măcinată este adăugată în vasul de extracție de 5 litri al unui extractor sub-critic contra-curent (Timatic Mini, Spello, Italia). pH-ul este corectat la 6,0 cu soluție 1 M HCl. Peste cele 100 grame pulpă se adaugă 900 ml apă și un amestec de enzime care acționează asupra polizaharidelor din peretele celular și feruloil-esteraze. Amestecul de enzime care acționează asupra polizaharidelor din peretele celular și feruloil-esteraze este alcătuit din pectinază și β -glucanaze, dozate ca 5 unități pectinazice și de 2 unități feruloil-esterazice la o activitate antioxidantă de 1 mg echivalent Trolox în substratului supus extracției.

O unitate de activitate pectinazică este definită ca acea cantitate de enzimă necesară pentru a elibera 1,0 μmole de zaharuri reducătoare măsurate ca acid D-galacturonic din pectină pe minut la pH 5,5 și 45°C.

O unitate feruloil-esterazică (FAE) este definită ca fiind cantitatea de enzimă necesară pentru eliberarea unui μmol de acid ferulic pe minut din etil-ferulate (0,39 mM) în tampon MOPS (100 mM), pH 6,0, la 45°C.

Amestecul de pectinază și β -glucanaze este **VinoTaste Pro** produs de **Novozymes** (Bagsvaerd, Danemarca). Feruloil-esteraza este un preparat de la



Biocatalysts (Cardiff, Marea-Britanie) produs din *Humicola insolens*, Depol 740L, standardizat în activitatea feruoil-esterazică (36 FAE per gram). Orice alte enzime cu aceleași caracteristici pot fi folosite.

Suspensia este amestecată energetic cu mixerul din doatarea echipamentului, și încălzită până la 60°C. Se menține 5 ore. Se procedează la ultrasonicarea repetată, câte 3 min la fiecare oră, cu o putere de 400 W – de exemplu cu VibraCell V505 (Sonic, Newtown, CT, SUA).

După 5 ore se oprește reacția de extracție enzimatică, iar materialul vegetal extras enzimatic este supus extracției în contracurent, prin aducerea peste materialul vegetal suspendat de etanol 96%, în raport de 6 kg etanol 96% la 4 kg suspensie apoasă, închiderea capacului extractorului și conectarea lui la compresorul de aer, etanșarea tuturor conexiunilor și extracția în contracurent solid-lichid pe un extractor de fluide subcritic (Timatic Mini, Spello), operat la 8 bari, la temperatura de 45°C, timp de 3 ore.

Materialului vegetal extras se separă de extractul alcoolic prin filtrare pe filtru cu plăci. Se concentrează extractul etanolic, până la 35% substanță uscată, cu recuperarea etanolului, pe un evaporator rotativ sub vid (Rotavapor® R-300, Buchi, Flavil). Se repetă etapele de mai sus de câte ori este nevoie pe același tip de substrat vegetal, pornind de la efectuarea unui spectru Raman, pentru a efectua un control rapid preventiv, care să permită dozarea enzimelor de extracție în funcție de activitatea antioxidantă a substratului.

În extractul concentrat se determină prin lichid cromatografie de înaltă presiune conținutul de acizi hidroxicinamici (Kammerer, Claus, Carle, & Schieber, 2004) și, respectiv, resveratrol (Careri, Corradini, Elviri, Nicoletti, & Zagnoni, 2003) și activitatea antioxidantă e captare a radicalului DPPH, 2,2-difenil-1-picrililhidrazil.

Compoziția de extract vegetal sinergic conține minimum 2,7 grame de resveratrol, 12,2 grame de acizi hidroxicinamici totali și 18,3 grame oligozaharide pectice la 100 ml extract etanolic concentrat și are o activitate antioxidantă de captare a radicalului DPPH, 2,2-difenil-1-picrililhidrazil, de cel puțin 3,5 mg echivalent Trolox per g extract.

Exemplul 2. Se lucrează ca în exemplu 1 cu următoarele diferențe. Materialul vegetal utilizat este pulbere de afine din care s-a extras sucul, pentru calibrarea activității antioxidante prin spectroscopie Raman se iau picurile de la 1610 cm⁻¹. Temperatura de extracție enzimatică este de 55°C.



Exemplul 3. Se lucrează ca în exemplu 1 cu următoarele diferențe. Materialul vegetal utilizat este reprezentat de mure din care s-a extras sucul.

Exemplul 4. Se lucrează ca în exemplu 1 cu următoarele diferențe. Materialul vegetal utilizat este boasca de struguri.



Revendicări

1. Compoziție de extract vegetal sinergic conform invenției **caracterizată prin aceea că** are un conținut minim de 2,7 grame de resveratrol, 12,2 grame de acizi hidroxicinamici totali și 18,3 grame oligozaharide pectice la 100 ml extract etanolic concentrat și are o activitate antioxidantă de captare a radicalului DPPH, 2,2-difenil-1-picrililhidrazil, de cel puțin 3,5 mg echivalent Trolox per g extract.
2. Procedeu de obținere a compoziției conform invenției caracterizată prin aceea că este alcătuit din următoarele etape: măcinarea umedă a materialului vegetal până la dimensiuni de 0,5 mm; extracția unei probe umede de 10-15 grame din materialului vegetal supus extracției, prin refluxare la Soxhlet timp de 8 ore și determinarea activității anti-oxidante de captare a radicalului DPPH, 2,2-difenil-1-picrililhidrazil; efectuarea unui spectru Raman 532 nm și stabilirea relațiilor de proporționalitate între picurile de la 1580-1610 cm^{-1} și activitatea antioxidantă de captare a radicalului DPPH; adăugarea peste materialul vegetal suspendat în raport de un kg la 10 kg apă, a unui amestec de enzime, alcătuit din hidrolaze care acționează asupra polizaharidelor din peretele celular și feruol-esteraze, urmată de extragerea asistată enzimatic a materialului vegetal în apă, timp de 5 ore la temperatura de 55-60°C și pH 6.0; ultrasonizarea repetată, câte 3 min la fiecare 30 min, cu o putere de 400 W, a substratului vegetal cu enzime; aducerea peste materialul vegetal suspendat de etanol 96%, în raport de 6 kg etanol 96% la 4 kg suspensie apoasă și extracția în contracurent solid-lichid pe un extractor de fluide subcritic, operat la 8 bari, la temperatura de 45°C, timp de 3 ore; separarea materialului vegetal de extractul alcoolic prin filtrare pe filtru cu plăci; concentrarea extractului etanolic, până la 35% substanță uscată, cu recuperarea etanolului; repetarea etapelor de mai sus de câte ori este nevoie pe același tip de substrat vegetal, pornind de la efectuarea unui spectru Raman, pentru a efectua un control rapid preventiv, care să permită dozarea enzimelor de extracție în funcție de activitatea antioxidantă a substratului.
3. Material vegetal utilizat în cadrul procedurii conform revendicării 2, **caracterizat prin aceea că** este pulpă de cătină din care s-a extras uleiul, pulpă de fructe de pădure, ca de ex. afinele sau murele din care s-a extras sucul, boască de struguri.
4. Amestec de enzime conform revendicării 2, caracterizat prin aceea că este alcătuit din pectinază și feruloil-esterază, dozate ca 5 unități pectinazice și de 10 unități feruloil-esterazice la o activitatea antioxidantă de 1 mg echivalent Trolox pe substratului supus extracției.



Nobin