(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 042327 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.02.03

(21) Номер заявки
202090554

(22) Дата подачи заявки
2018.09.21

(51) Int. Cl. ***A23L 5/43*** (2016.01)
C09B 61/00 (2006.01)
C09B 67/54 (2006.01)
A23K 20/179 (2016.01)

(54) УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ КОМПОЗИЦИИ ПИГМЕНТА КРАСНОЙ СВЕКЛЫ

(31) **17192720.5**
(32) **2017.09.22**
(33) **EP**
(43) **2020.07.17**
(86) **PCT/EP2018/075607**
(87) **WO 2019/057896 2019.03.28**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ОТЕРРА А/С; ЮНИВЕРСИТИ ОФ КОПЕНХАГЕН (DK)

(72) Изобретатель:
Эспин Грегорио Барба, Луэткен Хенрик Влк, Йорнсгор Бьярне, Муэллер Ренате Петра Бригитте, Джанфезова Тсанета, Глид Стефан, Мадсен Бьёрн (DK)

(74) Представитель:
Можайский М.А. (RU)

(56) CHETHANA ET AL.: "Aqueous two phase extraction for purification and concentration of betalains", JOURNAL OF FOOD ENGINEERING, BARKING, ESSEX, GB, vol. 81, no. 4, 15 March 2007 (2007-03-15), pages 679-687, XP005924075, ISSN: 0260-8774, DOI:10.1016/J.JFOODENG.2006.12.021, Abstract; 1; 2.2-2.3; 2.4.1; 3.3; 3.7; 4; figures 1, 6

LETCIA CHRISTINA PIRES GONALVES ET AL.: "A comparative study of the purification of betanin", FOOD CHEMISTRY, ELSEVIER LTD, NL, vol. 131, no. 1, 23 August 2011 (2011-08-23), pages 231-238, XP028310781, ISSN: 0308-8146, DOI:10.1016/J.FOODCHEM.2011.08.067 [retrieved on 2011-08-30], Abstract; 1; 2.2-2.3; 4.1-4.2; figures 1-2; table 2

US-A-4401454

SINGH O S, CHHABRA N: "EFFECT OF PLANT GROWTH REGULATORS ON BETA CYANIN SYNTHESIS IN CELOSIA-ARGENTEA-VAR-CRISTATA IN THE DARK", Z. PFLANZENPHYSIOL., April 1976 (1976-04), pages 189-196, XP009501413, ISSN: 0044-328X, DOI:10.1016/S0044-328X(73)80001-7, Abstract; p.193 par.2

SHIFENG CAO ET AL.: "The effects of host defence elicitors on betacyanin accumulation in seedlings", FOOD CHEMISTRY, vol. 134, no. 4, 5 April 2012 (2012-04-05), pages 1715-1718, XP028507424, ISSN: 0308-8146, DOI: 10.1016/J.FOODCHEM.2012.03.129 [retrieved on 2012-04-05], Abstract; 1; 3; table 1

IQBAL SINGH BHANDAL ET AL.: "Effect of Some Growth Substances and Phenolic Compounds on Membrane Permeability in Beet Root", PHYTON. ANNALES REI BOTANICAE, vol. 25, no. 1, 28 February 1985 (1985-02-28), pages 177-184, XP055422759, AT ISSN: 0079-2047, Abstract; 3.1; table 1

(57) Способ получения композиции пигмента беталаина из растений красной свеклы, включающий опрыскивание листьев перед сбором урожая образующим этилен соединением, и применение полученной композиции пигмента беталаина для окрашивания съедобного продукта.

042327 B1

042327 B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к способу получения композиции пигмента беталаина из растений красной свеклы, включающему предуборочное опрыскивание листьев образующим этилен соединением, к полученной композиции пигмента беталаина и применению полученной композиции пигмента беталаина для окрашивания съедобного продукта.

Уровень техники

Имеется растущий спрос на натуральные пищевые красители, которые могут заменить синтетические красители вследствие как ужесточающихся правовых ограничений, так и озабоченности потребителей. Красная свекла (Beta vulgaris L. spp. vulgaris), известная как свекла, является источником натуральных красителей беталаинов. Беталаины - это широко распространенные водорастворимые пигменты, которые замещают антоцианы в растениях отряда Caryophyllales (Гвоздикоцветных, или Гвоздичноцветных). Беталаины имеют более высокую растворимость в воде и красящую способность, чем антоцианины. Беталаины представляют собой прекрасную замену синтетическим пищевым красителям красно-фиолетового цвета.

Беталаины хорошо известны как группа соединений, придающих цвет пищевым продуктам, овощам и цветам и ответственны за красный, оранжевый и желтый цвета многих видов растений. Беталаины - нетоксичные пигменты, и поэтому беталаины, выделенные из фруктов и овощей, использовали в качестве пищевых красителей для обеспечения цвета в цветовом диапазоне от красного до желтого.

Композиция беталаина, получаемая из красной свеклы, содержит две разные водорастворимые группы пигментов, а именно: красно-фиолетовые бетацианидины и желтые бетаксантины. В зрелой красной свекле 75-90% всех бетацианидинов состоят из пигмента бетанина, имеющего красный цвет. Бетаксантины составляют незначительную часть композиции беталаина, в которой вульгаксантин, имеющий желтый цвет, является основным из присутствующих бетаксантинов.

Существует постоянное желание улучшить композицию пигмента, полученную из красной свеклы: получить улучшенную стабильность, более высокий выход, более яркие цвета и т.д.

Соединения, которые образуют этилен при опрыскивании растений, приобретают большое экономическое значение, поскольку используются для ускорения различных реакций на этилен, таких как стимуляция цветения, стимуляция потока латекса, опадание листьев и веточек, созревание плодов, опадание плодов и раскрывание стручка.

Ряд таких образующих этилен соединений известен в уровне техники - подходящими примерами являются, например, этефон (Ethephon), силаид (Silaid), альзоль (Alsol), ACC (M. S. Reid, 1988; Yoseph Levy et al. 1979).

Chethana et al.: "Aqueous two phase extraction for purification и concentration of betalains", J. Food Eng., vol. 81, no. 4, 15 March 2007, p. 679-687 раскрывает очищенные композиции пигмента беталаина, полученные путем экстракции из красной свеклы. Двухфазная экстракция приводила к удалению сахаров и полимеров, что давало очищенную композицию беталаина.

Leticia Christina Pires Gonalves et al.: "A comparative study of the purification of betanin", Food chemistry, vol. 131, no. 1, 23 August 2011, p. 231-238 также раскрывает композиции пигмента беталаина, полученные семью разными способами, причем ионообменная хроматография является наиболее эффективным способом. Очищенные образцы содержали более высокое количество его эпимера изобетанина, чем свежий экстракт.

US 4401454, Fritz Charles et al., 30 August 1983 относится к процессу регуляции роста для получения урожайности культур. Усиления цвета выращиваемой культуры не выявлено или не являлось задачей, кроме того, корнеплоды не исследовались, а в случае картофеля, который также находится под землей, применяли нанесение этих соединений на картофель перед посадкой и не наносили путем опрыскивания листьев.

Singh O.S. et al.: "Effect of plant growth regulators on beta cyanin synthesis in Celosia-argentea var. christata in the dark", Z. Planzenphysiol. April 1976, p. 189-196 описывает проросшие семена Celosia argentea var. christata, инкубированные в чашках Петри, содержащих также ауксин, цитокинин, ингибитор или этилен для исследования влияния их действия на синтез бетацианина на проростках, выращенных в условиях темноты.

В Shifeng Cao et al.: "The effects of host defence elicitors on betacyanin accumulation in seedlings", Food Chemistry, 5 April 2012, vol. 134, no. 4, p. 1715.1718 семена A Mangostanus прорастали в буфере, содержащем этефон (Ethephon). Обработка проростков этефоном (Ethephon) показала, что 0,1 ммоль и 1 ммоль не вызывали накопления пигмента в проростках Ammaranthus, тогда как 5 ммоль, по-видимому, оказывали воздействие.

В Iqbal Singh Bhandal et al.: "Effect of some growth substances and phenolic compounds on membrane permeability in Beet Root", Phyton. Annales Rei Botanicae, vol. 25, no. 1, 28 February 1985, p. 177-184 красную свеклу использовали в качестве экспериментального материала в исследовании, где истечение бетацианина и изменения проводимости были взяты в качестве двух параметров проницаемости. Это показало, что этефон (Ethephon) способствовал истечению бетацианина при 50 об/мин.

Испытание опрыскивания этефоном (Ethephon) растений красной свеклы (на листья) и исследова-

ние воздействия на накопление пигмента в органе растения, отличающемся от обработанного, никогда ранее не проводилось.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к способу повышения концентрации беталаинов и отношения бетанина к вульгаксантину в красной свекле.

Неожиданно было обнаружено, что при опрыскивании листьев красной свеклы образующим этилен соединением перед сбором урожая средняя концентрация пигмента беталаина в корнеплодах обработанных растений красной свеклы значительно увеличивалась по сравнению с соответствующими контрольными образцами. Кроме того, неожиданно было обнаружено, что опрыскивание листьев растений красной свеклы перед сбором урожая повышает отношение бетанина к вульгаксантину в композиции беталаина из красной свеклы. Кроме того, неожиданно было обнаружено, что опрыскивание листьев растений красной свеклы перед сбором урожая повышает отношение беталаина к общему количеству растворимых твердых веществ в красной свекле.

Первый аспект настоящего изобретения относится к способу получения композиции пигмента беталаина из растений красной свеклы, включающему следующие стадии:

(i) опрыскивание листьев растений красной свеклы образующим этилен соединением;

(ii) сбор растений красной свеклы, опрысканных на стадии (i), и

(iii) выделение беталаинов из растений красной свеклы, собранных на стадии (ii), с получением при этом композиции пигмента беталаина.

Второй аспект настоящего изобретения относится к композиции пигмента беталаина, полученной согласно способу по первому аспекту и/или его воплощению.

Третий аспект настоящего изобретения относится к применению композиции пигмента беталаина, полученной согласно способу по первому аспекту и/или его воплощению, для окрашивания съедобного продукта.

Подробное описание изобретения

Композиция пигмента беталаина, получаемая из красной свеклы, содержит две разные группы водорастворимых пигментов, а именно: красно-фиолетовые бетацианидины и желтые бетаксантины. В зрелой красной свекле 75-90% всех бетацианидинов состоят из пигмента бетанина, имеющего красный цвет. Бетаксантины составляют небольшую часть композиции беталаина, где вульгаксантин, имеющий желтый цвет, является наиболее доминирующим. Бетанин более стабилен, чем вульгаксантин, как при комнатной температуре, так и при нагревании.

По указанным выше причинам, желательно повысить отношение бетанина к вульгаксантину в композиции пигмента красной свеклы для получения более яркого красного цвета.

Таким образом, настоящее изобретение относится к способу получения композиции пигмента беталаина из красной свеклы, который дает повышенный выход беталаинов, в частности бетанинов, и/или более высокое отношение бетанина к вульгаксантину.

Частное воплощение настоящего изобретения относится к способу получения композиции пигмента беталаина из растений красной свеклы, включающему следующие стадии:

(i) опрыскивание листьев растений красной свеклы образующим этилен соединением;

(ii) сбор растений красной свеклы, опрысканных на стадии (i), и

(iii) выделение беталаинов из растений красной свеклы, собранных на стадии (ii), с получением при этом композиции пигмента беталаина.

Ясно, что растения красной свеклы представляют в данной заявке растения красной свеклы, которые способны к производству пигментов бетанина.

В предпочтительном воплощении красная свекла представляет собой Beta vulgaris L. spp. vulgaris.

Выражение "опрыскивание листьев" относится к методу опрыскивания растений путем нанесения жидких активных ингредиентов непосредственно на их листья. В настоящем изобретении опрыскивание листьев включает нанесение одного или более образующих этилен соединений непосредственно на листья растения красной свеклы.

Выражение "образующее этилен соединение", именуемое далее также "ОЭС", относится в данной заявке к соединению, которое выделяет этилен при опрыскивании растений или действует как прекурсор этилена, как АСС (1-аминоциклопропан-1-карбоновая кислота).

Образующие этилен соединения, подходящие в настоящем изобретении, включают, не ограничиваясь указанными, (2-хлорэтил)фосфоновую кислоту, (2-хлорэтил)метилбис(фенилметокси)силан, (2-хлорэтил)трис(2-метоксиэтокси)силан и/или 1-аминоциклопропан-1-карбоновую кислоту. Образующее этилен соединение по настоящему изобретению называют также активным ингредиентом.

Ряд таких образующих этилен соединений коммерчески доступны, например, 2-хлорэтилфосфоновая кислота под торговыми наименованиями этефон (Ethephon), бромефлор (Bromeflor), арвест (Arvest) и этрел (Ethrel), 2-хлорэтилметилбис(фенилметокси)силан или бис(бензилокси)(2-хлорэтил)метилсилан под торговым наименованием силаид (Silaid) и 2-хлорэтилтрис(2-метоксиэтокси)силан под торговым наименованием альзоль (Alsol).

В частном воплощении настоящего изобретения используют два или более разных образующих

этилен соединения.

В предпочтительном воплощении настоящего изобретения образующее этилен соединение представляет собой 2-хлорэтилфосфоновую кислоту.

Способ по настоящему изобретению можно предпочтительно использовать для коммерчески оправданного производства в большом масштабе, то есть выделения в большом масштабе пигментов беталаина из растений красной свеклы.

Соответственно, может быть предпочтительно, что выделение беталаинов на стадии (iii) проводят из по меньшей мере 15 разных собранных растений красной свеклы, листья которых были опрысканы выделяющим этилен соединением, более предпочтительно из по меньшей мере 100 разных собранных растений красной свеклы, еще более предпочтительно из по меньшей мере 500 разных собранных растений красной свеклы, например, из по меньшей мере 1000 разных собранных растений красной свеклы.

В частном воплощении настоящего изобретения количество пигментов беталаина в опрысканной красной свекле и/или пигментов беталаина, полученных на стадии (iii) способа по первому аспекту, является количеством пигмента беталаина, которое по меньшей мере на 4% (мас./мас.) выше, более предпочтительно по меньшей мере на 5% (мас./мас.) выше, еще более предпочтительно по меньшей мере на 7% (мас./мас.) выше и еще более предпочтительно по меньшей мере на 8% (мас./мас.) выше, например, на 10 % (мас./мас.) выше и даже на 15% (мас./мас.) выше по сравнению с количеством пигмента беталаина, которое получают в контрольном эксперименте, в котором не применяют образующего этилен соединения на стадии (i).

Количество пигмента беталаина в красной свекле задается как общее количество бетанина и вульгаксантина.

Количество пигмента бетанина в растениях красной свеклы определяют в соответствии со следующим способом. Вымытую красную свеклу измельчают и гомогенизируют в растворе 3% серной кислоты (1/1, мас./мас.). Затем полученный тонкоизмельченный гомогенизат смешивают с деминерализованной водой (1/2, масс/масс), встряхивают и центрифугируют в течение 20 мин при 4500 об/мин, полученную надосадочную жидкость разбавляют до концентрации, подходящей для использования в спектрофотометре, в 33 ммолярном KH_2PO_4 (pH 6,5), и измеряют поглощение при 476 нм для бетанина с помощью УФ-спектрофометра в видимой области.

Затем полученное поглощение используют для вычисления концентрации бетанина с помощью формулы: концентрация бетанина красной свеклы = $A \times DF \times MW/\varepsilon \times L$ [мг·кг$^{-1}$], где A - величина поглощения разбавленного бетанина, скорректированная на поглощение вульгаксантина при 476 нм, DF - коэффициент разбавления от экстракта красной свеклы до измеряемого образца, MW - молекулярная масса бетанина, ε - молярный коэффициент экстинкции и L - длина пути кюветы.

Количество пигмента вульгаксантина в растениях красной свеклы измеряют согласно следующему способу. Вымытую красную свеклу измельчают и гомогенизируют в растворе 3% серной кислоты (1/1, мас./мас.). Затем полученный тонкоизмельченный гомогенизат смешивают с деминерализованной водой (1/2, мас./мас.), встряхивают и центрифугируют в течение 20 мин при 4500 об/мин, полученную надосадочную жидкость разбавляют до концентрации, подходящей для использования в спектрофотометре, в 33 ммолярном KH_2PO_4 (pH 6,5) и измеряют поглощение при 538 нм для вульгаксантина с помощью УФ-спектрофометра в видимой области.

Затем полученное поглощение используют для вычисления концентрации вульгаксантина с помощью формулы: концентрация вульгаксантина красной свеклы = $A \times DF \times MW/\varepsilon \times L$ [мг·кг$^{-1}$], где A - величина поглощения разбавленного вульгаксантина, скорректированная на поглощение бетанина при 538 нм, DF - коэффициент разбавления от экстракта красной свеклы до измеряемого образца, MW - молекулярная масса бетанина, ε - молярный коэффициент экстинкции и L - длина пути кюветы.

В частном воплощении настоящего изобретения количество пигментов бетанина в опрысканной красной свекле и/или пигментов бетанина, полученных на стадии (iii) способа по первому аспекту, представляют собой количество пигмента бетанина, которое по меньшей мере на 5% выше (мас./мас.), например, по меньшей мере на 7% выше (мас./мас.), например, по меньшей мере на 10% выше (мас./мас.), например, по меньшей мере на 12% выше (мас./мас.), например, по меньшей мере на 15% выше (мас./мас.), например, по меньшей мере на 20% выше по сравнению с количеством пигмента бетанина, которое получают в контрольном эксперименте, в котором не применяют образующего этилен соединения на стадии (i).

В частном воплощении настоящего изобретения отношение бетанина к вульгаксантину составляет по меньшей мере 5:1, в более предпочтительном воплощении отношение бетанина к вульгаксантину составляет по меньшей мере 5,5:1, в наиболее предпочтительном воплощении настоящего изобретения отношение бетанина к вульгаксантину составляет по меньшей мере 6:1. В еще одном воплощении настоящего изобретения отношение бетанина к вульгаксантину составляет менее 20:1, например, менее 15:1.

В еще одном воплощении настоящего изобретения отношение бетанина к вульгаксантину увеличилось по меньшей мере на 5%, например, по меньшей мере на 10%, например, по меньшей мере на 15%, например, по меньшей мере на 20% по сравнению с контрольным образцом, листья которого не опры-

скивали образующим этилен соединением.

В частном воплощении настоящего изобретения отношение беталаина к общему количеству растворимых твердых веществ TSS (англ. - Total Soluble solids) увеличилось по меньшей мере на 5%, например, по меньшей мере на 10%, например, по меньшей мере на 15%, например, по меньшей мере на 20% по сравнению с контрольным образцом, листья которого не опрыскивали образующим этилен соединением.

TSS измеряют с помощью ручного рефрактометра (Refracto 30PX/GS Mettler-Toledo Inc., OH, USA), работающего в диапазоне от 0 до 85% Brix. Экстракт красной свеклы отфильтровывают через мембранные фильтры с размером пор 0,45 мкм и проводят измерения Brix с помощью 1 мл фильтрата.

Как понятно специалисту из данной заявки, цель контрольного эксперимента состоит в том, чтобы проанализировать эффект от применения образующего этилен соединения. Соответственно, любое условие в контрольном эксперименте (как, например, время сбора урожая на стадии (ii), конкретный способ выделения на стадии (iii) и т.д.) должно быть идентичным способу, в котором используют образующее этилен соединение по первому аспекту.

В частном воплощении настоящего изобретения общее количество образующего этилен соединения, нанесенного путем опрыскивания на стадии (i) на урожай красной свеклы от посева до сбора урожая, составляет количество от более 50 г ОЭС га$^{-1}$ до 10000 г ОЭС га$^{-1}$. Предпочтительно, количество образующего этилен соединения, нанесенного на стадии (i), составляет от 100 г ОЭС га$^{-1}$ до 5000 г ОЭС га$^{-1}$, более предпочтительно составляет количество от 200 г ОЭС га$^{-1}$ до 2500 г ОЭС га$^{-1}$, как, например, количество от 400 г ОЭС га$^{-1}$ до 1250 г ОЭС га$^{-1}$; например, количество от 400 г ОЭС га$^{-1}$ до 1250 г ОЭС га$^{-1}$.

В частном воплощении настоящего изобретения количество образующего этилен соединения, нанесенного при каждом опрыскивании на стадии (i), составляет количество от 20 г ОЭС га$^{-1}$ до 5000 г ОЭС га$^{-1}$. Предпочтительно, количество образующего этилен соединения, нанесенного на стадии (i), составляет количество от 100 г ОЭС га$^{-1}$ до 1000 г ОЭС га$^{-1}$, более предпочтительно составляет количество от 200 г ОЭС га$^{-1}$ до 500 г ОЭС га$^{-1}$.

В частном воплощении настоящего изобретения количество образующего этилен соединения, нанесенного при каждом опрыскивании на стадии (i), составляет более 20 г ОЭС га$^{-1}$, например, более 50 г ОЭС га$^{-1}$, например, более 100 г ОЭС га$^{-1}$, например, более 200 г ОЭС га$^{-1}$.Количество образующего этилен соединения, нанесенного при каждом опрыскивании на стадии (i), в частности меньше 5000 г ОЭС га$^{-1}$, например, меньше 1000 г ОЭС га$^{-1}$, например, менее 500 г га$^{-1}$.

В частном воплощении настоящего изобретения опрыскивание листьев образующим этилен соединением проводят через 1 неделю после посадки, предпочтительно проводят через 2 недели после посадки. Может быть предпочтительным провести его через 4 недели после посадки.

Может быть предпочтительным, что опрыскивание листьев образующим этилен соединением на стадии (i), проводят более одного раза (например, 2 раза) перед сбором урожая растений красной свеклы на стадии (ii). Может быть предпочтительным, что его проводят по меньшей мере 3 раза перед сбором урожая растений красной свеклы на стадии (ii), например, по меньшей мере 4 раза, например, по меньшей мере 5 раз перед сбором урожая растений красной свеклы или даже 6 раз или более перед сбором урожая.

Стадия (ii) первого аспекта относится к сбору урожая растений красной свеклы стадии (i). Сбор урожая, проводимый на стадии (ii), проводят, как известно в уровне техники.

В отношении стадии (ii), может быть предпочтительно, что сбор урожая растений красной свеклы на стадии (ii) по первому аспекту проводят через 4 недели после посадки, предпочтительно проводят через 6 недель после посадки, например, через 8 недель после посадки. В другом воплощении сбор урожая растений красной свеклы на стадии (ii) проводят ранее 25 недель после посадки, например, ранее 20 недель после посадки. В частном воплощении сбор урожая проводят между 8 и 15 неделями, например, 10 и 14 неделями.

Стадия (iii) по первому аспекту относится к выделению беталаинов из собранного урожая растений красной свеклы на стадии (ii) и при этом получают композицию пигмента беталаина. Таким образом, беталаины экстрагируют из красной свеклы.

Термин "выделение" на стадии (iii) следует понимать как некую жидкость (например, воду) и/или твердые вещества отделяют от беталаинов – т.е. композиция пигмента беталаина не содержит всей жидкости (например, воды) и/или твердых веществ из красной свеклы.

В частном воплощении настоящего изобретения выделение беталаинов из красной свеклы осуществляют путем промывания клубней красной свеклы и разрезания их вдоль. Клубни свеклы измельчают и гомогенизируют в 3% растворе серной кислоты (1/1, мас./мас.). Затем полученный тонкоизмельченный гомогенизат смешивают с деминерализованной водой (1/2, мас./мас.) и встряхивают. Наконец, образец центрифугируют в течение 20 мин при 4500 об/мин.

В частности, полученная на стадии (iii) композиция пигмента беталаина может представлять собой сок.

Специалист в данной области техники обычно знает, как осуществить стадию (iii) – т.е. это можно

сделать согласно уровню техники, например, путем экстракции из клубней собранного урожая растений красной свеклы.

Выделение беталаинов на стадии (iii) может включать, не ограничиваясь указанными, любую из следующих стадий: экстракцию пигментов беталаина путем промывания сырья из свеклы, разложения, измельчения, нагревания, добавления ферментов и воды, выстаивания (фр. - stabulation), декантации, отжима, очистки на смолах и концентрирования путем удаления воды или другой жидкости, сушки, например, сушки распылением и/или лиофилизацией.

Композиция пигмента беталаина по настоящему изобретению может находиться в жидком или порошкообразном состоянии. Она может иметь чистоту выше 0,3% беталаина в жидком состоянии или более 0,5% в порошкообразном состоянии. Очистку можно осуществлять, например, путем очистки с помощью макропористых смол с получением желаемой степени чистоты. Очистку можно осуществлять, например, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с получением желаемой степени чистоты.

Композиция пигмента по настоящему изобретению может представлять собой жидкую композицию или порошковую композицию. В частном воплощении композиция со стадии (iii) высушена. Предпочтительно композиция высушена в сушилке распылением. В частном воплощении композиция содержит менее 10% воды, например, менее 5% воды.

Может быть предпочтительно, что полученная на стадии (iii) композиция пигмента беталаина представляет собой жидкую композицию или высушенную композицию, которая содержит менее 60% (мас./мас.) жидкости (например, воды) например, менее 50% (мас./мас.), например, менее 40% (мас./мас.), например, менее 30% (мас./мас.).

Настоящее изобретение также относится к применению композиции пигмента беталаина, полученной согласно способу по настоящему изобретению, для окрашивания съедобного продукта.

Съедобный продукт по настоящему изобретению включает пищевой продукт, кормовой продукт, фармацевтический и/или лекарственный препарат для перорального введения.

Пищевые продукты по настоящему изобретению включают, не ограничиваясь указанными, молочные продукты, сок, напиток, жевательный мармелад, варенье, джем, кондитерские изделия, шоколадные драже, оболочки колбасных изделий, пасту, макароны, сыр, полуфабрикаты и/или экструдированные пищевые продукты.

Следующие воплощения являются предпочтительными воплощениями настоящего изобретения.

Воплощение 1. Способ получения композиции пигмента беталаина из растений красной свеклы, включающий следующие стадии:

(i) опрыскивание листьев растений красной свеклы образующим этилен соединением;

(ii) сбор урожая растений красной свеклы, опрысканных на стадии (i), и

(iii) выделение беталаинов из растений красной свеклы, собранных в качестве урожая на стадии (ii), и при этом получение композиции пигмента беталаина.

Воплощение 2. Способ получения композиции пигмента беталаина из растений красной свеклы, включающий следующие стадии:

(i) опрыскивание листьев растений красной свеклы образующим этилен соединением;

(ii) сбор урожая растений красной свеклы, опрысканных на стадии (i), и

(iii) экстракция беталаинов из растений красной свеклы, собранных в качестве урожая на стадии (ii), и при этом получение композиции пигмента беталаина.

Воплощение 3. Способ получения композиции пигмента беталаина из растений красной свеклы, включающий следующие стадии:

(i) опрыскивание листьев растений красной свеклы образующим этилен соединением;

(ii) сбор урожая растений красной свеклы, опрысканных на стадии (i), и

(iii) получение сока, содержащего беталаины, из растений красной свеклы, собранных в качестве урожая на стадии (ii), и при этом получение композиции пигмента беталаина.

Воплощение 4. Способ согласно любому из предшествующих воплощений, в котором образующее этилен соединение выбирают из группы, состоящей из 2-хлорэтилфосфоновой кислоты; (2-хлорэтил)метилбис-(фенилметокси)силана; (2-хлорэтил)трис(2-метоксиэтокси)силана и/или 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты.

Воплощение 5. Способ согласно воплощению 4, в котором образующее этилен соединение представляет собой 2-хлорэтилфосфоновую кислоту.

Воплощение 6. Способ согласно любому из предшествующих воплощений, в котором композиция пигмента беталаина содержит бетанин и вульгаксантин.

Воплощение 7. Способ согласно воплощению 6, в котором отношение бетанина к вульгаксантину возрастает по меньшей мере на 5% по сравнению с контрольным экспериментом, в котором не применяют образующего этилен соединения на стадии (i).

Воплощение 8. Способ согласно воплощению 6, в котором отношение бетанина к вульгаксантину возрастает по меньшей мере на 10% по сравнению с контрольным экспериментом, в котором не применяют образующего этилен соединения на стадии (i).

Воплощение 9. Способ согласно воплощению 6, в котором отношение бетанина к вульгаксантину возрастает по меньшей мере на 15% по сравнению с контрольным экспериментом, в котором не применяют образующего этилен соединения на стадии (i).

Воплощение 10. Способ согласно воплощению 6, в котором отношение бетанина к вульгаксантину возрастает по меньшей мере на 20% по сравнению с контрольным экспериментом, в котором не применяют образующего этилен соединения на стадии (i).

Воплощение 11. Способ согласно воплощению 6, в котором отношение бетанина к вульгаксантину возрастает по меньшей мере на 25% по сравнению с контрольным экспериментом, в котором не применяют образующего этилен соединения на стадии (i).

Воплощение 12. Способ согласно любому из предшествующих воплощений, в котором выделение беталаинов на стадии (iii) проводят из по меньшей мере 100 разных растений красной свеклы, собранных в качестве урожая.

Воплощение 13. Способ согласно любому из предшествующих воплощений, в котором количество полученных пигментов беталаина по меньшей мере на 5% выше (мас./мас.) по сравнению с количеством пигментов беталаина, которое получают в контрольном эксперименте, в котором не применяют образующего этилен соединения на стадии (i).

Воплощение 14. Способ согласно любому из предшествующих воплощений, в котором количество полученных пигментов беталаина по меньшей мере на 10% выше (мас./мас.) по сравнению с количеством пигментов беталаина, которое получают в контрольном эксперименте, в котором не применяют образующего этилен соединения на стадии (i).

Воплощение 15. Способ согласно любому из предшествующих воплощений, в котором отношение беталаина к общему количеству растворимых твердых веществ TSS (англ. - total soluble solids) в красной свекле возрастает по меньшей мере на 5%, например, по меньшей мере на 10%, например, по меньшей мере на 15%, например, по меньшей мере на 20%, например, по меньшей мере на 25% по сравнению с контрольным экспериментом, в котором не применяют образующего этилен соединения на стадии (i).

Воплощение 16. Способ согласно любому из предшествующих воплощений, в котором количество образующего этилен соединения, нанесенного при каждом опрыскивании на стадии (i) воплощения 1, составляет количество от 20 г ОЭС $га^{-1}$ до 5000 г ОЭС $га^{-1}$.

Воплощение 17. Способ согласно любому из предшествующих воплощений, в котором количество образующего этилен соединения, нанесенного при каждом опрыскивании на стадии (i) воплощения 1, составляет количество от 100 г ОЭС $га^{-1}$ до 1000 г ОЭС $га^{-1}$.

Воплощение 18. Способ согласно любому из предшествующих воплощений, в котором общее количество образующего этилен соединения, нанесенного путем опрыскивания на стадии (i) на урожай красной свеклы от посева до сбора урожая, составляет количество от более 50 г ОЭС $га^{-1}$ до 10000 г ОЭС $га^{-1}$.

Воплощение 19. Способ согласно любому из предшествующих воплощений, в котором общее количество образующего этилен соединения, нанесенного путем опрыскивания на стадии (i) на урожай красной свеклы от посева до сбора урожая, составляет количество от более 100 г ОЭС $га^{-1}$ до 5000 г ОЭС $га^{-1}$.

Воплощение 20. Способ согласно любому из предшествующих воплощений, в котором опрыскивание листьев образующим этилен соединением на стадии (i) проводят через 2 недели после посадки.

Воплощение 21. Способ согласно любому из предшествующих воплощений, в котором опрыскивание листьев образующим этилен соединением на стадии (i) проводят по меньшей мере 3 раза перед сбором урожая растений красной свеклы на стадии (ii) и в котором сбор урожая растений красной свеклы на стадии (ii) воплощения 1 проводят через 6 недель после посадки.

Воплощение 22. Композиция пигмента беталаина, полученная по любому из предшествующих воплощений способа.

Воплощение 23. Применение композиции пигмента беталаина согласно воплощению 22 для окрашивания съедобного продукта.

Воплощение 24. Применение согласно воплощению 23, в котором продукт представляет собой съедобный продукт, и этот съедобный продукт представляет собой пищевой продукт, кормовой продукт, фармацевтический и/или лекарственный препарат.

Воплощение 25. Применение согласно воплощению 24, в котором пищевой продукт выбран из молочных продуктов, сока, напитка, жевательного мармелада, варенья, джема, кондитерских изделий, шоколадных драже, оболочек колбасных изделий, пасты, макарон, сыра, полуфабрикатов и/или экструдированных пищевых продуктов.

Воплощения, описанные в данной заявке, можно лучше понять со ссылкой на следующие неограничивающие примеры.

Примеры

Пример 1.

Опрыскивание листьев растений красной свеклы образующим этилен соединением.

Материалы и методы.

Растения: красная свекла Monty Rz и Belushi Rz. Семена были предоставлены Rijk Zwaan (De Lier, Нидерланды).

Образующее этилен соединение (ОЭС): 2-хлорэтилфосфоновая кислота.

Полевые опыты проводились в Hoejbakkegaard (широта 55, долгота 40,1-40,3; Дания) в 2015 году, где трехрядные участки располагали в виде случайно расположенных блоков с тремя повторениями. Осадки в виде дождя дополнялись поливом на протяжении роста красной свеклы, чтобы избежать недостатка воды. Нанесения образующего этилен соединения (ОЭС), 2-хлорэтилфосфоновой кислоты (CERONE® марка ETHEPHON, 39,9% активного ингредиента, Bayer Crop Science, Leverkusen, Германия), в концентрации 360 г га$^{-1}$, на листья осуществляли с помощью CO_2 ранцевой воздуходувки на расстоянии 50 см друг от друга, используя оборудование для ручного распыления, предназначенное для применения в сельском хозяйстве. Нанесение ОЭС начинали через 5 недель после посева и продолжали каждые 3 недели, всего пять нанесений. Растения выращивали в суглинистой почве, используя методы, рекомендованные для выращивания и защиты растений при выращивании урожая красной свеклы.

Опыт 1. Растения выращивали на участках, представляющих собой ряды длиной 4,5 м, при этом единственный сбор урожая из средней части каждого ряда проводили через 16 недель после посева.

Опыт 2. Участки представляли собой ряды длиной 12 м, при этом проводили несколько сборов урожая с отдельных участков ряда во время выращивания (через 3, 6, 9, 12, 15 и 18 недель после посева). Образцы биологического материала для последующего анализа состояли из 20 целых клубней свеклы, собранных в качестве урожая с участка.

Сбор урожая и приготовление образца.

Образцы биологического материала, состоящие из 20 клубней свеклы, промывали и разрезали вдоль. Из них одну половину размалывали и гомогенизировали в 3%-ном растворе серной кислоты (1/1, мас./мас.) с помощью промышленного блендера Waring® с двумя скоростями (VWR - Bie & Berntsen, Herlev, Дания). Полученный тонкоизмельченный гомогенизат смешивали с деминерализованной водой (1/2, мас./мас.) и встряхивали. Наконец, образец центрифугировали в течение 20 мин при 4500 об/мин и для дальнейшего анализа использовали надосадочную жидкость (экстракт).

Определение содержания бетанина (Bn) и вульгаксантина (Vx) Bn и Vx определяли спектрофотометрически. Экстракт клубней свеклы разбавляли до подходящей концентрации в 33 ммолярном KH_2PO_4 (pH 6,5) и измеряли поглощение при 476 нм и 538 нм для Bn и Vx, соответственно, с помощью УФ-спектрофометра в видимой области (Thermo Scientific Evolution™ 220, Waltham, MA, USA). Концентрации Bn и Vx выражали в мг·кг$^{-1}$ свежей массы (FW), используя величину поглощения, молекулярную массу и коэффициент экстинкции для Bn и Vx.

Определение содержания сухого вещества (DM) и общего количества растворимых твердых веществ (TSS).

TSS измеряли с помощью ручного рефрактометра (Refracto 30PX/GS Mettler-Toledo Inc., OH, USA), работающего в диапазоне Brix от 0 до 85%. Экстракт клубней свеклы отфильтровывали через мембранные фильтры с размером пор 0,45 мкм и проводили измерения Brix с помощью 1 мл фильтрата.

DM определяли после того, как высушивали образцы до постоянной массы при 100°C в течение 24 ч, по разнице массы между свежими и сухими образцами. TSS выражали в виде процентной доли сухого вещества.

Результаты.

Опыт 1.

Эффект обработки образующего этилен соединения на пигменты беталаина и выходы клубней свеклы 16-недельной зрелости.

Действие этилена в качестве предуборочного элиситора пигментов беталаина исследовали на клубнях красной свеклы после опрыскивания листьев с помощью ОЭС. Эффект ОЭС на содержание Bn и Vx анализировали на корнеплодах 16-недельной зрелости. В целом, обработанные с помощью ОЭС растения демонстрировали повышенное содержание Bn в обоих исследованных сортах. Напротив, содержание Vx несущественно отличалось у необработанных и обработанных растений. В табл. 1 указаны содержание бетанина (Bn) и вульгаксантина (Vx) в расчете на FW и DW, отношение бетанина к вульгаксантину (Bn:Vx) и отношение беталаинов к TSS (беталаины:TSS) обработанных ОЭС растений красной свеклы в тех образцах, которые одновременно собраны в качестве урожая (через 16 недель после посева).

Таблица 1

сорт		ОЭС (г га$^{-1}$)	Беталаины (мг кг$^{-1}$ FW)			Беталаины:TSS	Беталаины (г кг$^{-1}$ DM)
			Bn	Vx	Bn:Vx		
Полевое испытание 1	Monty Rz	0	1872	432	4,38	0,115	18,6
		360	2166	386	5,79	0,154	21,9
	Belushi Rz	0	1240	339	3,67	0,090	13,9
		360	1575	274	5,82	0,126	17,4
Полевое испытание 2	Monty Rz	0	1972	405	4,94	0,094	17,0
		360	2458	364	6,88	0,132	21,5
	Belushi Rz	0	1418	276	5,28	0,074	12,9
		360	1584	247	6,42	0,088	15,0

Среднее значение содержания Bn в обработанных растениях Monty Rz варьировало в диапазоне от 2166 до 2458 мг·кг$^{-1}$ FW, что на 25% больше по сравнению со значениями в необработанных растениях (от 1872 до 1972 мг·кг$^{-1}$ FW). Аналогично, содержание Bn в корнеплодах обработанных растений Belushi Rz показало средние значения от 1575 до 1584 мг·кг$^{-1}$ FW, в то время как соответствующие значения в необработанных растениях находились в диапазоне от 1240 до 1418 мг·кг$^{-1}$ FW (табл. 1), что в среднем на 20% больше. В результате повышения концентрации Bn и неизменности концентрации Vx, отношение Bn:Vn существенно повышалось у обоих сортов при обработке этефоном (табл. 1). Обработанные ОЭС корнеплоды свеклы показали более низкие значения DM по сравнению с необработанными корнеплодами. Соответственно, разница концентраций беталаинов (Bn + Vx) в расчете на FW между необработанными и обработанными корнеплодами улучшалась, когда данные выражали в расчете на DM (табл. 1).

Обработанные ОЭС корнеплоды Monty Rz показали среднее отношение Bn:Vx 6,3, что на 34% выше по сравнению с отношением в необработанных растениях (4,7), в то время как соответствующее отношение в Belushi Rz (6,1), что на 36% выше по сравнению с отношением в необработанных растениях (4,5). Нанесения этефона не оказывали существенного воздействия на продуктивность обоих сортов или на урожай свеклы в тоннах на гектар. Снижение уровня растворимых твердых веществ в красной свекле способствует концентрированию свекольного окрашивания во время переработки. Следовательно, повышение отношения беталаинов к TSS (беталаины:TSS) улучшает коммерческую ценность продукта. В настоящей работе, обработанные ОЭС корнеплоды красной свеклы показали более низкое среднее значение TSS и более высокое содержание беталаина, чем в необработанных корнеплодах, что давало повышенноеу отношение беталаины:TSS для обоих сортов (табл. 1). Это означает повышение в среднем на 37% и 30% для Monty Rz и Belushi Rz, соответственно.

Опыт 2.

Накопление беталаина в процессе роста корнеплодов.

Воздействие 360 г ОЭС га$^{-1}$ на содержание Bn и Vx в расчете на DM и размер корнеплодов осуществляли в процессе всего периода выращивания через 3, 6, 9, 12, 15 и 18 недель после посева. В табл. 2 приведены содержания бетанина (Bn) и вульгаксантина (Vx) и отношение бетанина к вульгаксантину (Bn:Bx), отслеживаемое в корнеплодах, которые не были обработаны, и в обработанной с помощью 360 г ОЭС га$^{-1}$ красной свекле (через 3-18 недель после посева). Не наблюдалось существенной разницы в массе и диаметре корнеплодов при сравнении необработанных и обработанных корнеплодов для обоих сортов при каждом сборе урожая.

В целом, по сравнению с необработанными растениями среднее значение содержания Bn в корнеплодах было выше в корнеплодах обработанных растений при каждом сборе урожая после начала обработки и в среднем показало повышение по всем сборам урожая для Monty Rz на 17% и для Belushi Rz на 10%. Противоположное произошло со средним значением Vx в корнеплодах, которое показало более низкие значения в необработанных корнеплодах во время роста корнеплодов, в среднем на 5% ниже для Monty Rz и на 20% ниже для Belushi Rz (табл. 2). Разница в концентрации Bn в расчете на FW между необработанными и обработанными корнеплодами увеличивалась в расчете на DM.

Таблица 2

Недель после посева	ОЭС (г га$^{-1}$)	Monty Rz беталаины (мг кг$^{-1}$ FW)			Belushi Rz беталаины (мг кг$^{-1}$ FW)		
		Bn	Vx	Bn:Vx	Bn	Vx	Bn:Vx
3	0	1562	39,4	39,7	987	33,0	30,0
	360	1343	32,3	41,6	945	24,3	39,0
6	0	2625	70,2	37,7	2465	70,2	40,5
	360	2867	62,3	46,5	2577	58,4	45,7
9	0	2495	154	16,2	1980	171	12,0
	360	2685	180	14,9	2144	128	17,2
12	0	1982	250	8,0	1551	208	7,52
	360	2475	239	10,5	1683	157	11,1
15	0	1766	383	4,62	1296	279	4,66
	360	2274	304	7,56	1442	211	6,84
18	0	1910	486	3,94	1180	306	3,87
	360	2219	455	4,89	1369	286	4,85

Содержание Bn и Vx соответствует различной кинетике во время роста корнеплодов. Содержание Bn показало пик через 9 недель после посева (2867 и 2577 мг·кг$^{-1}$ FW в Monty Rz и Belushi Rz, соответственно) с последующим постепенным снижением до конца периода выращивания (табл. 2). Напротив, содержание Vx повышалось с течением времени, достигая 486 и 306 мг·кг$^{-1}$ FW в Monty Rz и Belushi Rz, соответственно, через 18 недель после посева (табл. 2). Самое высокое отношение Bn:Vx в обоих сортах (46) было достигнуто на ранних стадиях выращивания корнеплодов через 6 недель после посева, с последующим снижением до конца периода выращивания. Отношение Bn:Vx было в среднем по всем сборам на 17 и 35% выше в обработанных с помощью ОЭС корнеплодах Monty Rz и Belushi Rz, соответственно.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения композиции пигмента беталаина из растений красной свеклы, включающий следующие стадии:

(i) опрыскивание листьев растений красной свеклы образующим этилен соединением;

(ii) сбор урожая растений красной свеклы, опрысканных на стадии (i); и

(iii) выделение беталаинов из растений красной свеклы, собранных в качестве урожая на стадии (ii), и при этом получение композиции пигмента беталаина.

2. Способ по п.1, в котором образующим этилен соединением является 2-хлорэтилфосфоновая кислота, (2-хлорэтил)метилбис-(фенилметокси)силан; (2-хлорэтил)трис(2-метоксиэтокси)силан и/или 1-аминоциклопропан-1-карбоновая кислота.

3. Способ по п.2, в котором образующее этилен соединение представляет собой 2-хлорэтилфосфоновую кислоту.

4. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором композиция пигмента беталаина содержит бетанин и вульгаксантин.

5. Способ по п.4, в котором отношение бетанина к вульгаксантину возрастает по меньшей мере на 5% по сравнению с контрольным экспериментом, в котором не применяют образующего этилен соединения на стадии (i).

6. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором выделение беталаинов на стадии (iii) проводят из по меньшей мере 100 разных собранных в качестве урожая растений красной свеклы.

7. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором количество полученных пигментов беталаина по меньшей мере на 5% выше (мас./мас.) по сравнению с количеством пигментов беталаина, полученных в контрольном эксперименте, в котором не применяют образующего этилен соединения на стадии (i).

8. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором отношение беталаина к общему количеству растворимых твердых веществ в красной свекле возрастает по меньшей мере на 5% по сравнению с контрольным экспериментом, в котором не применяют образующего этилен соединения на стадии (i).

9. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором количество образующего этилен соединения, нанесенного при каждом опрыскивании на стадии (i) по п.1, составляет количество от 20 г образующего этилен соединения га$^{-1}$ до 5000 г образующего этилен соединения га$^{-1}$.

10. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором общее количество образующего этилен соединения, нанесенного путем распыления на стадии (i) на урожай красной свеклы от посева до

сбора урожая, составляет количество от более чем 50 г образующего этилен соединения га$^{-1}$ до 10000 г образующего этилен соединения га$^{-1}$.

11. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором опрыскивание листьев образующим этилен соединением на стадии (i) проводят через 2 недели после посадки.

12. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором опрыскивание листьев образующим этилен соединением на стадии (i) проводят по меньшей мере 3 раза до сбора урожая растений красной свеклы на стадии (ii) и в котором сбор урожая растений красной свеклы на стадии (ii) по п.1 проводят через 6 недель после посадки.

Евразийская патентная организация, ЕАПВ
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2