



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **41370** (13) **U**
(51) МПК (2009)
C12N 1/14
C07C 403/00
A01G 1/04

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ КАРОТИНОВІСНИХ ЛІПОФІЛЬНИХ КОМПЛЕКСІВ З БІОМАСИ ГРИБА BLAKESLEA TRISPORA

1

2

(21) u200808821

(22) 04.07.2008

(24) 25.05.2009

(46) 25.05.2009, Бюл.№ 10, 2009 р.

(72) РУДАСЬ ОЛЕКСАНДР МИКОЛАЙОВИЧ, UA

(73) РУДАСЬ ОЛЕКСАНДР МИКОЛАЙОВИЧ, UA

(57) 1. Спосіб отримання каротиновмісних ліпофільних комплексів шляхом екстракції сировини ефірними оліями гомогенного складу з чистотою не менше 98%, що включає відокремлення екстракту від сировини, видалення екстрагента з екстракту та очищення останнього, який **відрізняється** тим, що екстракції піддають висушену та гомогенізовану біомасу гриба *Blakeslea trispora*, екстракцію проводять ефірною олією, вибраною з цінеолу, Д-лімонену, альфа-пінену тощо, при об'ємному співвідношенні екстрагента та сировини 30:1-70:1 з наступним розділенням фаз екстрагента, проекстрагованої біомаси та культурального середовища, причому очищення здійснюють шляхом лужного гідролізу з подальшим видаленням утворених продуктів омилення, а з вільного від екстрагента очищеного екстракту шляхом фільтрації виділяють кристали бета-каротину з наступною їх промивкою та сушінням.

2. Спосіб за п.1, який **відрізняється** тим, що біомасу гриба *Blakeslea trispora* гомогенізують шляхом занурення біомаси у рідкий азот або будь-яким іншим придатним чином.

3. Спосіб за п.1, який **відрізняється** тим, що екстракцію здійснюють при перемішуванні протягом 20-120 хвилин.

4. Спосіб за п.1, який **відрізняється** тим, що розділення фаз екстракту та проекстрагованої біомаси гриба *Blakeslea trispora* досягають шляхом відстоювання або центрифугуванням при понад 500g протягом не менше 1 хвилини, або фільтрацією, або будь-яким іншим придатним чином.

5. Спосіб за п.1, який **відрізняється** тим, що лужний гідроліз здійснюють шляхом додавання NaOH або КОН у твердому стані або у вигляді насиченого спиртового чи водного розчину, або $\text{Ca}(\text{OH})_2$ у твердому стані, а реакцію проводять при перемішуванні при температурі 45-55°C протягом 60-120 хвилин.

6. Спосіб за п.1, п.4, який **відрізняється** тим, що лужному гідролізу піддають при необхідності біомасу гриба *Blakeslea trispora* до початку екстракції або реакційну масу під час екстракції, або одержаний екстракт з вмістом екстрагента, або екстракт після видалення екстрагента, причому відповідно концентрація луку дорівнює 5-25% відносно зазначених продуктів.

7. Спосіб за п.1, який **відрізняється** тим, що видалення продуктів омилення здійснюють шляхом промивання спиртами або водно-спиртовими розчинами, або осадженням з іонами кальцію, або сорбцією на діоксиді кремнію, або сорбцією на проекстрагованій біомасі гриба *Blakeslea trispora*, або іншим придатним чином.

8. Спосіб за п.1, який **відрізняється** тим, що видалення екстрагента з екстракту здійснюють під вакуумом при залишковому тиску 5-10мм рт.ст. і температурі 35-45°C.

Корисна модель належить до галузі біотехнології, а саме до отримання бета-каротину з біомаси мікроскопічного гриба *Blakeslea trispora*.

Бета-каротин є провітаміном А, а також розглядається як перспективна субстанція для отримання фармацевтичних і ветеринарних препаратів з антиоксидантною, імуномодуючою, протиракровою, противиразковою, радіопротекторною акти-

вністю, поновлюючих репродуктивну функцію і поліпшуючих стан шкіряних покривів. Бета-каротин широко використовується в косметичі, а також як харчовий барвник і допоміжна забарвлююча речовина при виробництві лікарських форм.

Мікробіологічне виробництво бета-каротину з біомаси мукорового гриба *Blakeslea trispora* залишається одним з найпоширеніших серед основних

(19) **UA** (11) **41370** (13) **U**

трьох промислових джерел отримання бета-каротину (два інших - хімічний синтез та виділення з мікроводорості *Dunaliella salina*). Бета-каротин гриба *Blakeslea trispora* має найбільшу провітамінну активність внаслідок ізомерного складу (містить переважно повністю-транс-ізомер), хоча і поступається за антиоксидантною активністю бета-каротину з мікроводорості *Dunaliella salina*, що містить природну суміш повністю-транс і 9-цис-ізомерів бета-каротину (саме останнім притаманна потужна антиоксидантна активність), альфа-каротину і інших природних каротиноїдів, що посилюють антиоксидантну дію бета-каротину.

Відомі до цього часу технології отримання бета-каротину з біомаси гриба використовують розчинники, що є продуктами хімічного синтезу або перегонки нафти. Ці розчинники токсичні, вибухо- або пожежонебезпечні, і засновані на них технології не відповідають сучасній тенденції розвитку виробництва - безпеці для людей і навколишнього середовища.

Найближчим до заявленого є спосіб [міжнародна заявка W02007057549 A2 з пріоритетом 10.11.2005 FR, опублікована 24.05.2007], який полягає в одержанні рослинних препаратів шляхом екстракції рослинного матеріалу природною ефірною олією, сумішшю ефірних олій або сумішшю однієї або декількох ефірних олій з етиловим спиртом при нагріванні до 40-45°C, подальшого відділення екстракту від рослинного матеріалу і відгонки розчинника під вакуумом, з водяною парою або методом молекулярної дистillaції. У якості екстрагентів в прототипі пропонуються Д-лімонен і альфа-пінен, які заздалегідь очищені від інших терпеноїдів і перекисів шляхом відгонки з водяною парою або під вакуумом. У прототипі заявлені одержані за даною технологією екстракти наступної рослинної сировини: зерен кави, кореневища куркуми, квіток арніки гірської, трави чистотілу, ромашки, горчавки і сангвінарії.

Проте відомий спосіб призначений для одержання екстрактів рослинного походження і не може бути поширений безпосередньо на екстрагування такого специфічного об'єкту як гриби, зокрема *Blakeslea trispora*, з метою одержання каротинвміщуючих біологічно активних продуктів ліпофільної природи та кристалічного бета-каротину.

Передбачуваний спосіб також повинен суттєво відрізнятись від способів екстракції іншого біотехнологічного джерела бета-каротину - мікроводорості *Dunaliella salina*. На відміну від мікроводорості *Dunaliella salina*, що не має клітинної стінки, та на відміну від рослинної сировини, клітини якої оточені целюлозною клітинною стінкою, гіфи гриба *Blakeslea trispora* мають значно міцнішу хітин-глюканову клітинну стінку, що утруднює процеси екстракції і очищення екстракту, якщо останнє проводиться одночасно з екстракцією. Біомаса мікроводорості видобувається у вигляді суспензії в рідкому середовищі, що вміщує лише мінеральні солі, тоді як гриб культивують в середовищі, багатому на органічні сполуки, що можуть значно забруднювати екстракт. Тому в сучасних технологіях екстракції біомаси гриба передують її відокремлення

від поживного середовища та висушування до залишкового вмісту вологи 3-7%. Біомаса гриба має значно більший вміст ліпідів, ніж рослинна або водоростева сировина.

В основу корисної моделі поставлене завдання створення нового способу отримання каротинвміщуючих ліпофільних комплексів та нових продуктів, одержаних за таким способом. Передбачувана корисна модель завдяки неочевидному використанню ефірних олій для екстракції біомаси гриба *Blakeslea trispora* у сукупності з іншими заявленими параметрами способу повністю виключає використання неприродних, токсичних, пожежо- та вибухонебезпечних компонентів при здійсненні корисної моделі і дозволяє одержати принаймні 3 продукти, зокрема, кристалічний бета-каротин з вмістом повністю-транс-бета-каротину 93-98% і виходом 65-80% від його вмісту в вихідній сировині.

Поставлене завдання вирішується таким чином, що у способі отримання бета-каротину шляхом екстракції біомаси гриба ефірними оліями гомогенного складу з чистотою не менше 98%), що включає відокремлення екстракту від сировини, видалення екстрагенту з екстракту та очищення останнього, корисною моделлю передбачено, що екстракції піддають гомогенізовану біомасу гриба *Blakeslea trispora*, екстракцію проводять ефірною олією, вибраною з цінеолу, альфа-пінену, Д-лімонену, при об'ємному співвідношенні екстрагенту до сировини 30:1-70:1 з наступним розділенням фаз екстракту та проекстрагованої біомаси, очищення здійснюють шляхом лужного гідролізу з подальшим видаленням утворених продуктів омилення, після видалення екстрагенту очищений екстракт фільтрують, відділені кристали бета-каротину промивають і сушать.

Згідно з корисною моделлю екстракції передую, або відбувається одночасно з екстракцією, гомогенізація біомаси *Blakeslea trispora* будь-яким придатним способом - за допомогою електричного гомогенізатору, шарового млину або попередньої обробки рідким азотом. Неочевидним і оригінальним в даному способі є те, що залишкового вмісту вологи (3-7%) виявляється достатньо для утворення в гіфах гриба кристалів льоду і часткового порушення цілісності клітинної стінки, що значно полегшує подальшу екстракцію. Екстракцію здійснюють при перемішуванні протягом 60-120 хвилин. Такий тривалий час екстракції дозволяє, незважаючи на міцну клітинну стінку гриба, отримувати вихід бета-каротину до екстракту 65-80% порівняно з його початковим вмістом в сировині.

У відповідності з корисною моделлю розділення фаз екстрагенту та проекстрагованої біомаси здійснюють шляхом відстоювання. Суха біомаса гриба не утворює емульсії під час екстракції, має досить велику щільність і легко відстоюється. Проте заявлений спосіб не виключає здійснення цього процесу шляхом центрифугування при понад 500 g протягом не менше 1 хвилини або фільтрації, або будь-яким іншим придатним чином.

Корисною моделлю передбачено, що очищення екстракту досягають через лужний гідроліз, який здійснюють шляхом додавання NaOH або KOH у

твердому стані або у вигляді насиченого спиртового чи водного розчину або $\text{Ca}(\text{OH})_2$ у твердому стані, а реакцію проводять при перемішуванні при температурі 45-55°C протягом 60-120 хвилин.

Корисною моделлю передбачені можливі варіанти здійснення заявленого способу, а саме лужному гідролізу піддають при необхідності біомасу гриба *Blakeslea trispora* до початку екстракції, або реакційну масу під час екстракції, або одержаний екстракт з вмістом екстрагенту, або екстракт після видалення екстрагенту, причому відповідно концентрація луку дорівнює 5-25% відносно зазначених продуктів.

Згідно з корисною моделлю при необхідності варіюється процес видалення продуктів омилення, який здійснюють шляхом промивання спиртами або водноспиртовими розчинами, або осадженням з іонами кальцію, або сорбцією на діоксиді кремнію, або сорбцією на проекекстрагованій біомасі *Blakeslea trispora*, або іншим придатним чином.

Згідно з корисною моделлю видалення екстрагенту з екстракту здійснюють під вакуумом при залишковому тиску 5-10мм рт.ст. і температурі 35-45°C.

У відповідності з корисною моделлю продукт у вигляді екстракту з вмістом екстрагенту являє собою розчин в природній ефірній олії, що містить не менше 0,22% каротиноїдів (бета-каротин - не менше 0,2%, альфа-каротин - не більше 0,02%), не більше 0,25% природних жирних кислот та їх гліцеридів, не більше 0,05% фосфоліпідів, не більше 0,25% стеринів, не менше 0,08% токоферолу, і може бути використаний для зовнішнього застосування у медицині, ветеринарії, косметології.

Заявлений спосіб ілюструється прикладом.

До хімічного стакану зважували 10г сухої біомаси *Blakeslea trispora* з концентрацією бета-каротину 7,5%. Стакан занурювали на декілька секунд в ємність з рідким азотом. Після цього в стакан одночасно при перемішуванні доливали 2-2,5мл 50% водного розчину NaOH і 0,5л альфа-пінена, підігрітих до 55°C. Суміш перемішували при температурі 55°C протягом 60 хвилин, після

чого давали їй відстоятися. Спостерігали розділення фаз: верхня фаза являла собою рубіново-вишневий екстракт, нижня - осад біомаси. Екстракт декантували. Концентрація бета-каротину в екстракті становила 1г/л. Екстракт випаровували на вакуумному ротаційному випарнику при залишковому тиску 5мм рт.ст. і температурі 35°C до об'єму концентрата 30-50мл. Отриману рідину темно-вишневого кольору фільтрували під вакуумом через воронку Бюхнера із заправленою в неї металеву сіткою з розміром пір 20мкм. Фільтрат з колби Бунзена переливали на часову скляку і доводили до кипіння на водяній бані при залишковому тиску 5мм рт.ст. і температурі 35°C. Осад на воронці Бюхнера промивали 50мл етилового спирту і висушували, подаючи у воронку азот з балона. Кристали мали вигляд досить великих (до 3 мм) ромбічних пластинок синюватого кольору з металічним блиском. Кристалічний осад знімали з фільтра і зважували. Його маса становила 450мг. Маса осаду на часовому склі становила 50мг. Загальний вихід кристалів становив 66% від вмісту бета-каротину в вихідному концентраті біомаси.

Аналіз складу кристалів одержаного продукту - природного бета-каротину за допомогою ВЕЖХ на колонці Nucleosil C18 150×4,6мм, 5мкм показав наступне: бета-каротин (пвністю-транс ізомер) - 94,5%, альфа-каротин - 5,5%.

Таким чином, заявлено новий спосіб одержання каротинвміщуючих ліпофільних комплексів з біомаси гриба *Blakeslea trispora* шляхом екстракції очищеними ефірними оліями гомогенного складу. За заявленим способом можуть бути одержані з економічно доцільним виходом принаймні три продукти, вміщуючи каротиноїди та інші біологічно активні речовини ліофільної природи, зокрема кристалічний бета-каротин, придатні для використання у медицині, ветеринарії, косметології, харчовій промисловості тощо.

Заявлений спосіб передбачає використання лише природних реагентів, є безвідходним та екологічно чистим.