



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 81961

(13) C2

(51) МПК (2006)

C12N 1/12

A01G 7/00

C07C 403/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ КРИСТАЛІЧНОГО БЕТА-КАРОТИНУ

1

(21) а200600839

(22) 31.01.2006

(24) 25.02.2008

(72) РУДАСЬ ОЛЕКСАНДР МИКОЛАЙОВИЧ, UA,
ТАТИЩЕВ ЄВГЕН ВОЛОДИМИРОВИЧ, UA,
ТКАЧЕНКО ВОЛОДИМИР ГРИГОРОВИЧ, UA,
КОМАРИСТА ВІКТОРІЯ ПАВЛІВНА, UA,
ДЮНЯШЕВ СЕРГІЙ ВІКТОРОВИЧ, UA

(73) РУДАСЬ ОЛЕКСАНДР МИКОЛАЙОВИЧ, UA

(56) RU 2112808 C1, 10.06.1998.

US 20020025548 A1, 28.02.2002.

UA 74177 C2, 15.11.2005.

UA 74111 C2, 15.10.2006.

UA 67742 C2, 15.2004.

JP 2000175696 A, 27.06.2000.

(57) 1.Спосіб одержання кристалічного бета-каротину, що включає його екстрагування з природної біомаси етилацетатом з наступною кристалізацією з одержаного екстракту, відокремленням та сушінням утворених кристалів, який **відрізняється** тим, що екстрагування бета-каротину проводять безпосередньо етилацетатом з водної фази, що містить біомасу мікроводорості *Dunaliella salina*, кристалізацію бета-каротину здійснюють шляхом випарювання з екстракту

2

розчинника під вакуумом при температурі 34-36 °C при постійному додаванні нових порцій екстракту і відфільтровуванні утворених кристалів бета-каротину.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що водною фазою є природна ропа або живильне середовище з концентрацією NaCl близько 250 г/л.

3. Спосіб за п. 1, п. 2, який **відрізняється** тим, що співвідношення водної фази і розчинника 1:1-1:5.

4. Спосіб за пп. 1-3, який **відрізняється** тим, що у процесі кристалізації нові порції екстрагенту постійно додають таким чином, що концентрація кристалів бета-каротину у екстракті підтримується на рівні 1-2 %.

5. Спосіб за пп. 1-4, який **відрізняється** тим, що постійно здійснюють відбір кристалів бета-каротину з чистотою не менше 96 %.

6. Спосіб за пп. 1-5, який **відрізняється** тим, що при зниженні чистоти кристалів бета-каротину нижче 96 % додавання нових порцій екстракту припиняють, залишок екстракту упарюють до видалення розчинника з одержанням концентрату ліпофільних компонентів біомаси мікроводоростей роду *Dunaliella*.

Винахід відноситься до біотехнології, а саме до способів одержання високоочищеного кристалічного бета-каротину з мікроводоростей роду *Dunaliella*, і може бути використаний у фармацевтичній, медичній, косметології, харчовій промисловості, сільському господарстві.

Бета-каротин є цінною біологічно активною речовиною, яку використовують для одержання вітамінних і лікарських препаратів з антиоксидантною, радіопротекторною, геропротекторною, антиканцерогенною дією та виготовлення косметичних засобів. Бета-каротин знайшов також широке застосування у харчовій промисловості як біологічно активна добавка та натуральний барвник різноманітних харчових продуктів. Важливе значення має застосування

бета-каротину як добавки до кормів у тваринництві. Таким чином існує висока потреба у бета-каротині, яка постійно зростає.

Субстанцію бета-каротину виробляють у вигляді масляних розчинів та у кристалічній формі. Кристалічний бета-каротин є універсальним для виробництва будь-яких лікарських форм та виробів з вмістом бета-каротину. Він більш стійкий до окислення та краще зберігається, особливо у вакуумній упаковці.

У залежності від джерел одержання розрізняють бета-каротин синтетичного походження, мікробіологічний бета-каротин, одержаний з мікроскопічних грибів, переважно *Blakeslea trispora*, та натуральний бета-каротин з рослинної сировини і мікроводоростей.

(13) C2

(11) 81961

(19) UA

Виробництво синтетичного бета-каротину передбачає використання органічних реагентів, токсичних для людини, і потребує багатостадійного очищення продукту від попередників та небажаних побічних продуктів синтезу. Мікробіологічний (грибний) бета-каротин за хімічним складом аналогічний синтетичному і містить переважно повністю транс-ізомер бета-каротину, який протипоказаний особам з підвищеним окислювальним навантаженням, наприклад курцям. Найціннішим є бета-каротин рослинного походження, який є комплексом повністю транс-ізомеру і 9-цис-ізомеру бета-каротину з невеликою домішкою альфа-каротину та інших каротиноїдів. Такий комплекс має більш виражену провітамінну (за рахунок транс-ізомеру) та антиоксидантну і противиразкову дію (за рахунок цис-ізомеру)на відміну від синтетичного і мікробіологічного бета-каротину. Натуральний бета-каротин містять клітини моркви, плодів шипшини, гарбуза, обліпихи та ін. Проте екстрагування з них бета-каротину ускладнено наявністю міцних целюлозних клітинних оболонок, крім того одержаний продукт потребує очищення від великої кількості домішок природних речовин, які можуть мати небажану біологічну активність. Натуральний бета-каротин промислово одержують поки що у вигляді масляного розчину з вмістом основної речовини 5-30%.

Перспективним джерелом для промислового одержання бета-каротину є мікроводорості роду *Dunaliella*, зокрема *Dunaliella salina* (D. salina). Бета-каротин, що міститься всередині клітин D. salina, повністю ідентичний бета-каротину моркви. Проте клітини D. salina не мають целюлозної оболонки, яка утруднює вивільнення бета-каротину з клітин інших рослин. D. salina природно росте у промислово незабруднених солоних озерах півдня України і Росії, які є практично невичерпним джерелом сировини для одержання бета-каротину. D. salina відносно легко культивуються також у фотобіореакторах.

Актуальною є проблема одержання кристалічного бета-каротину з високою чистотою на менше 96%. При одержанні бета-каротину з природних джерел шляхом екстракції виникає необхідність очищення екстракту від домішок, які вилучають з сировини разом з бета-каротином. Ліпідні домішки екстрагують тими ж самими розчинниками, що й бета-каротин. До екстракту потрапляють й водорозчинні домішки.

Сучасні способи одержання бета-каротину з натуральної сировини полягають у етапі екстракції та додаткових етапах очищення.

Відомий спосіб одержання кристалічного бета-каротину [РФ, пат. 2112808, МПК 6 C12P23/00, з. №95118342/13, заявл. 24.10.1995, опубл. 10.06.1998], який полягає у неодноразовій екстракції подрібненої маси гриба *Blakeslea trispora* соняшниковою олією спочатку при температурі 95-100°C при співвідношенні екстрагенту до сировини як 1:1,5-1:3, протягом 15-60 хв., а потім тією ж олією, нагрітою до 60-90°C. Одержані екстракти промивають полярним розчинником при 40-45°C, кристалізують при 10-

20°C протягом 1-3 діб, після чого одержану суспензію нагрівають до 40-60°C, фільтрують одержані кристали, які у свою чергу промивають полярним розчинником - етиловим спиртом при співвідношенні 1:3-1:25 при 50-55°C.

До недоліків відомого способу можна віднести багатостадійність очищення продукту, використання та суттєві витрати різних розчинників, неодноразове нагрівання, яке може викликати руйнування термолабільних речовин продукту.

Найближчим до заявленого є спосіб вилучення кристалічного бета-каротину з натурального джерела [США, № 2002/025548, МПК 7 C12P 23/00, заявл. 19.07.1996, опубл. 28.02.2002], який передбачає одержання високоочищеного кристалічного бета-каротину з неочищеного бета-каротину. Відомий спосіб полягає у екстракції бета-каротину з висушеної біомаси гриба *Blakeslea trispora* органічним розчинником, промивання екстракту водою, кристалізацію бета-каротину випарюванням розчинника з охолодженням екстракту, декілька промивань кристалів розчинниками, в яких бета-каротин досить погано розчиняється, зокрема етилацетатом, і, нарешті, сушку кристалів під вакуумом. Одержані кристали мають чистоту 95%.

Недоліками відомого способу можна вважати використання декількох різних розчинників, багатостадійність процесу очищення, а звідси - складність і підвищена вартість способу.

Завданням винаходу є створення нового способу одержання кристалічного бета-каротину з мікроводоростей роду *Dunaliella*, в якому шляхом екстракції бета-каротину безпосередньо з водної фази, наприклад, рапи озера, з вмістом біомаси краще D. salina, з наступною прямою кристалізацією виділеного екстракту одержують високочистий кристалічний бета-каротин (96%) без додаткових процедур очищення і відходів виробництва, оскільки в якості побічного продукту одержують концентрат ліпофільних компонентів біомаси D. salina, збагачений 9-цис-бета-каротином та вміщуючий рослинні тригліцериди, есенціальні жирні кислоти, хлорофіл, токоферол та ін. рослинні ліпіди, який є цінним продуктом і може знайти застосування як кормова домішка, у косметології та ін.

Поставлене завдання вирішується таким чином, що у способі одержання кристалічного бета-каротину, що включає його екстрагування з природної біомаси органічним розчинником з наступною кристалізацією з одержаного екстракту, відокремленням та сушкою утворених кристалів, і передбачає використання розчинника, вибраного з групи розчинників, у яких бета-каротин має відносно низьку розчинність, зокрема етилацетату, згідно з винаходом, екстрагування бета-каротину проводять безпосередньо етилацетатом з водної фази, що містить біомасу мікроводорості роду *Dunaliella*, кристалізацію бета-каротину здійснюють шляхом випарювання з екстракту розчинника під вакуумом при температурі 34-36°C при постійному додаванні нових порцій екстракту і

відфільтровуванні утворених кристалів бета-каротину.

Винаходом також передбачено, що водною фазою є природна рапа або живильне середовище з концентрацією NaCl близько 250 г/л.

У відповідності з винаходом співвідношення водної фази до розчинника становить не менше 1:1 і не більше 1:5.

Згідно з заявленим способом у процесі кристалізації нові порції екстрагенту постійно додають таким чином, що концентрація кристалів бета-каротину у екстракті підтримується на рівні 1-2%.

У відповідності з винаходом постійно здійснюють відбір кристалів бета-каротину з чистотою не менше 96%, а при зниженні чистоти кристалів бета-каротину нижче 96% додавання нових порцій екстракту припиняють, залишок екстракту упарюють до видалення розчинника з одержанням концентрату ліпофільних компонентів біомаси мікроводоростей роду *Dunaliella*, причому при здійсненні заявленого способу бажано використовувати *D. salina*.

В якості джерела одержання кристалічного бета-каротину заявлений спосіб передбачає використання *D. salina*, яка росте у природній рапі з вмістом NaCl близько 250 г/л. При цьому біомаса не відокремлюється від водного середовища (рапи або живильного середовища) і не висушується. Згідно з заявленим способом екстракцію проводять з водної фази з вмістом біомаси *D. salina*, яка може бути безпосередньо суспензією клітин мікроводорості у рапі. З метою підвищення економічності та ефективності способу бажано, щоб концентрація клітин *D. salina* у водній фазі була максимально можливою. Цього можна досягти або застосуванням методів інтенсивного культивування *D. salina*, або збиранням сирі (з вмістом водної фази) біомаси, накопиченої з навітреного боку відкритого водоймища, в якому росте *D. salina*, або відомими методами адсорбції на різних сорбентах, флоатації, флокуляції.

Використання в якості розчинника для одержання екстракту етилацетату обумовлено цілим рядом причин: етилацетат є відносно нешкідливим і дозволений до використання у харчовій промисловості, полярність етилацетату оптимальна для заявленого способу. Він достатньо полярний, щоб порушити цілісність мембран клітин *D. salina* і вивільнити з них бета-каротин, і достатньо неполярний, щоб при цьому розчиняти бета-каротин і практично не змішуватися з водою, що дозволяє здійснювати відмивання екстракту від водорозчинних домішок.

Відношення водної фази до розчинника повинно бути з одного боку достатньо малим для забезпечення вилучення бета-каротину з біомаси і розділення фаз при відстоюванні або центрифугуванні. З іншого боку це відношення повинно бути достатньо великим для ефективного відмивання водорозчинних домішок у процесі екстрагування бета-каротину. Дослідним шляхом визначено оптимальний діапазон співвідношення водної фази до розчинника, зокрема етилацетату, який знаходиться у межах 1:1 до 1:5 за об'ємом.

Згідно з винаходом екстракцію проводять додаванням етилацетату до водної фази, яка містить біомасу *D. salina*, при інтенсивному перемішуванні за допомогою механічної або турбулентної мішалки або колоїдного млину таким чином, щоб забезпечити максимальний контакт між водною фазою і фазою розчинника. При цьому всі водорозчинні домішки, які могли б забруднити екстракт, переходять у водну фазу, а бета-каротин і супутні ліпіди - у фазу розчинника - етилацетату. Вміст великої кількості солей у водній фазі сприяє кращому розділенню фаз і перешкоджає значному розчиненню води у етилацетаті (менше за 3% за об'ємом у порівнянні з 8,7% для чистої води).

З виділеної фази етилацетату проводять кристалізацію бета-каротину шляхом упарювання розчинника при температурі 34-36°C під вакуумом.

На відміну від прототипу автори відмовилися від охолодження екстракту для інтенсифікації процесу кристалізації з огляду на те, що охолодження викликає співосадження домішок, зокрема фосфоліпідів. Вибір етилацетату у якості розчинника має таку перевагу, що він досить погано розчиняє бета-каротин, проте добре розчиняє решту ліпідів. Завдяки цьому при випарюванні насичення екстракту для бета-каротину настає раніше (вже при його концентрації 7 г/л), ніж для домішок і кристали бета-каротину починають осідати з екстракту раніше інших речовин ліпідної природи навіть без охолодження.

Експериментальним шляхом виявлено, що на перших етапах кристалізації при концентрації кристалічного бета-каротину у екстракті 1-2% осідають кристали бета-каротину, які мають чистоту $\geq 96\%$. Подальше упарювання призводить до все більшого співосадження інших ліпідів. При повному упарюванні екстракту утворюється суспензія кристалів у жовтогарячій масляній рідині, що містить значну домішку тригліцеридів.

Процес кристалізації бета-каротину з бажаним ступенем чистоти $\geq 96\%$ без додаткового очищення від ліпідних домішок можна зробити безперервним, постійно додаючи нові порції до екстракту, що упарюється, і відбираючи кристали, що випали в осад. При цьому при випарюванні розчинника у екстракті будуть накопичуватися ліпіди, що поступово викличе їх співосадження з бета-каротином. У процесі упарювання необхідно постійно відбирати кристали, що осіли, і контролювати їх чистоту. Такий підхід дозволяє одержати кристалічний бета-каротин з чистотою $\geq 96\%$. і виходом продукту не менше 90%. Після того, як концентрація інших ліпідів у екстракті досягне насичення і почнеться їх співосадження з бета-каротином припиняють додавання нових порцій екстракту і повністю випарюють розчинник. Одержують маслянисту субстанцію зі щільністю 0,91-0,94 г/см³, яка є цінним побічним продуктом і може знайти застосування як кормова домішка, у косметології і т.і.

Заявлений спосіб є новим, не відомим з джерел інформації. При здійсненні заявленого способу шляхом екстрагування бета-каротину з водної фази з одночасним відмиванням екстракту від водорозчинних домішок, використанні

етилацетату в якості розчинника та проведення кристалізації при вибраних авторами умовах спостерігається неочевидний ефект відсутності включення домішок до кристалічної решітки бета-каротину.

Спосіб здійснюють наступним чином. Для екстрагування вилучають біомасу мікроводорості *D. salina*, не відокремлюючи її від водної фази (природної рапи, живильного середовища з вмістом NaCl 250-300 г/л). Це може бути суспензія клітин *D. salina* у рапі або сирий концентрат біомаси, одержаний методами адсорбції на різних сорбентах, флоатації, флокуляції. Бажано, щоб перед екстракцією цілісність клітин мікроводорості було порушено будь-яким з відомих способів: осмотичним шоком, гомогенізацією, ультразвуком, стрибком тиску. Найбільш бажано, щоб суспензія клітин пройшла через стрибок тиску, який не викликає повного руйнування і загибелі клітин, але є достатнім для видалення з них цитоплазматичних глобул, що містять бета-каротин і тригліцериди [Україна, пат. №74111, МПК7 C12N1/06, 1/12, A01G7/00 // C07C403/24, заявл. 29.07.2004, опубл. 17.10.2005, Бюл. №10].

До водної фази з вмістом біомаси *D. salina* додають як розчинник етилацетат при співвідношенні водна фаза: етилацетат 1:1-1:5. Екстракцію проводять при кімнатній температурі при інтенсивному перемішуванні протягом часу, достатнього для одночасного проведення екстракції і вимивання з екстракту водорозчинних домішок (за експериментальними даними не менше 15 хвилин). Після перемішування екстракт відстоюють протягом часу, достатнього для чіткого розділення фаз - водної та етилацетатної. Останню відокремлюють, збирають у відповідну ємність і піддають упарюванню під вакуумом при температурі 34-36°C. До екстракту, що упарюють, постійно додають нові порції екстракту для підтримання у екстракті концентрації кристалів бета-каротину на рівні 1-2%, що обумовлює осідання кристалів бета-каротину з чистотою $\geq 96\%$, які постійно відбирають, контролюючи їх чистоту. При зниженні чистоти кристалів припиняють додавання нових порцій, екстракт упарюють до видалення розчинника і одержують цінний побічний продукт з вмістом рослинних тригліцеридів, жирних кислот, токоферолу та інших рослинних ліпідів, збагачений 9-цис-бета-каротином.

Винахід ілюструється прикладами.

Приклад 1. Культуру *Dunaliella salina*, виділену з озера Сасик, вирощували в лабораторних умовах у плоскопаралельному фотобіореакторі. Початкова концентрація клітин у культурі становила 1млн/мл. За місяць вона досягла 5,4млн/мл через ділення клітин водоростей. Вміст бета-каротину у розрахунку на 1 клітину склав 22пг. П'ять порцій культури об'ємом по 2л кожна інтенсивно струшували з 2л етилацетату у окремих конусах на 5л протягом 15 хвилин. Після відстоювання протягом наступних 15 хвилин і утворення розділення ліпофільної та водної фаз верхню ліпофільну фазу з кожного конуса переливали у ємність-збірник, об'єднавши таким

чином всі 5 порцій екстракту, загальний об'єм якого склав 9,8л з вмістом бета-каротину 115,0 мг/л. Потім відлили 3л одержаного екстракту у судину вакуумного ротаційного випарювача і упарювали під вакуумом при -0,9атм на водяній лазні при температурі 35°C. Під час випарювання періодично додавали нові порції свіжого екстракту до одержання загального об'єму екстракту 3л і визначали концентрацію у ньому бета-каротину, розчиняючи аліквоту у чистому етилацетаті та визначаючи поглинання при 440нм на спектрофотометрі. Через добу після додавання останньої порції коли об'єм упарюваного екстракту досяг 150мл, було відмічено замутнення екстракту, який для подальшого випарювання помістили у колбу на 250мл і упарили до 40мл, одержавши як побічний продукт біологічно активний концентрат ліпофільних сполук *D. salina*. Кристалічний осад темно-червоного кольору, одержаний при випарюванні, відокремили центрифугуванням при 6000об/хв, досушили під вакуумом, зважили і проаналізували за допомогою методу високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Осад складався на 96% з бета-каротину (60%-транс-, 30%-цис-ізомери), 4% склали інші каротиноїди. Ліпідних домішок та домішок водорозчинних речовин на було виявлено. Маса кристалічного осаду склала 798мг, таким чином вихід кристалічного бета-каротину склав 67% від його вихідного вмісту у культурі.

Концентрація насичення для бета-каротину у етилацетаті при 35°C була приблизно 7г/л.

Приклад 2. Рапу з басейнів солепроміслю Геройське Херсонської області з вмістом 80 тис. клітин *Dunaliella salina* в 1мл при 50пг бета-каротину на клітину прокачували протягом 10 годин за допомогою насоса через колонку, яка вміщувала 25кг сорбенту - мілкодисперсного залізорудного концентрату. Після цього насос відключали, рапу зливали з колонки і вилучали сорбент. Сирий сорбент важив 27кг, тобто містив близько 1,8л рапи (при щільності рапи 1,20г/см³). Вміст відсорбованої біомаси *D. salina* у перерахунку на бета-каротин склав 600 мг на 1 кг сорбенту. Сорбент з рапою помістили у неіржавіючу ємність, і 15хв. перемішували за допомогою електричної мішалки з 10 л етилацетату при співвідношенні водна фаза: етилацетат 1:5. Після цього мішалку відключили, суспензію відстоювали до розділення фаз і водну фазу випустили через отвір у дні ємності. Об'єм одержаного екстракту склав 10л при концентрації у ньому бета-каротину 1,55г/л. Екстракт випарювали у колбі об'ємом 250мл при 35°C та -0,9атм. Після того, як об'єм упареного екстракту зменшувався до 15мл центрифугуванням відокремлювали кристали, що випали з екстракту, та досушували їх під вакуумом, об'єм екстракту у колбі знову доводили до 250мл і повторювали описаний вище процес знову до вичерпання попередньо одержаного екстракту. Сумарно одержали 14,5 г кристалів бета-каротину з чистотою не менше 96%, що підтверджено даними ВЕРХ, тобто вихід чистого кристалічного продукту склав майже 90% від його вихідного вмісту у рапі.

Упарювання трьох останніх порцій екстракту відбулося дуже повільно внаслідок накопичення в екстракті ліпідів. Центрифугування на цьому етапі припинили. Упарювання проводили до видалення етил ацетату. Було одержано близько 100мл червоної в'язкої смолистої речовини - концентрату ліпофільних сполук *Dunaliella salina*, так званої "водоростевої олії".

Таким чином заявлено новий безвідходний спосіб одержання кристалічного бета-каротину з мікроводорості *Dunaliella salina*, який дозволяє одержати кристалічний бета-каротин з високим ступенем чистоти $\geq 96\%$ шляхом прямої кристалізації екстракту без додаткових процедур очищення і відходів виробництва. В якості побічного продукту одержують біологічно активний концентрат ліпофільних компонентів біомаси *D. salina*, збагачений 9-цис-бета каротином.