



УКРАЇНА

(19) UA (11) 41367 (13) U  
(51) МПК (2009)  
C12N 1/12  
C07C 403/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

### (54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ КАРОТИНВІСНИХ ЛІПОФІЛЬНИХ КОМПЛЕКСІВ

1

(21) u200807501

(22) 02.06.2008

(24) 25.05.2009

(46) 25.05.2009, Бюл. № 10, 2009 р.

(72) РУДАСЬ ОЛЕКСАНДР МИКОЛАЙОВИЧ, UA,  
ТАТИЩЕВ ЄВГЕН ВОЛОДИМИРОВИЧ, UA

(73) РУДАСЬ ОЛЕКСАНДР МИКОЛАЙОВИЧ, UA,  
ТАТИЩЕВ ЄВГЕН ВОЛОДИМИРОВИЧ, UA

(57) 1. Спосіб отримання каротинвісних ліпофільних комплексів шляхом екстракції природної 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 дисперговану в ропі біомасу мікроводорості *Dunaliella salina*, екстракцію проводять ефірною олією, вибраною з цинеолу, D-лімонену, альфа-пінену тощо, при об'ємному співвідношенні екстрагента до сировини 1:2-1:3 з наступним розділенням фаз екстрагента, проекстрагованої біомаси та ропи, 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 сушкою.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що екстракцію здійснюють при перемішуванні протягом 20-60 хвилин.

3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що розділення фаз екстракту, проекстрагованої біомаси

2

мікроводорості *Dunaliella salina* та ропи досягають шляхом відстоювання при температурі 45-55°C, переважно 55°C, протягом 2-3 хвилин, або центрифугуванням при понад 1000 g протягом не менше 2 хвилин, або фільтрацією, або будь-яким іншим придатним чином.

4. 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 20-60 хвилин.

5. Спосіб за пп. 1, 4, який **відрізняється** тим, що лужному гідролізу піддають при необхідності біомасу мікроводорості *Dunaliella salina* 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.

6. 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 мікроводорості *Dunaliella salina*, або іншим придатним чином.

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

Корисна модель належить до галузі біотехнології, а саме до отримання природного комплексу каротиноїдів і натурального бета-каротину з мікроводорості *Dunaliella salina*.

Бета-каротин є провітаміном А, а також розглядається як перспективна субстанція для отримання фармацевтичних і ветеринарних препаратів з антиоксидантною, імуномодуючою, протираковою, противиразковою, радіопротекторною активністю, поновлюючих репродуктивну функцію і

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

Відомо три промислових джерела отримання бета-каротину: хімічний синтез, мікробіологічне виробництво з муковорого гриба *Blakeslea trispora* і виділення бета-каротину з мікроводорості *Dunaliella salina*. Бета-каротин мікроводорості *Dunaliella salina* має найбільшу біологічну актив-

(13) U

(11) 41367

(19) UA

ність внаслідок натурального ізомерного складу (містить природну суміш повністю транс і 9-цис ізомерів бета-каротину, альфа-каротину і інших природних каротиноїдів, що посилюють дію бета-каротину). Як джерело бета-каротину міководорості *Dunaliella salina* відповідає сучасним тенденціям розвитку виробництва лікарських засобів і харчових інгредієнтів, оскільки є цілком натуральною, генетично не модифікованою сировиною, що росте в природних умовах. Однак відомі до цього часу технології отримання бета-каротину з міководорості використовують розчинники, що є продуктами хімічного синтезу або перегонки нафти, що ставить під сумнів тезу про «натуральність» продукту, що отримується. Крім того, ці розчинники токсичні, вибухо- або пожежонебезпечні, і засновані на них технології не відповідають іншій 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 дистиляції. У якості екстрагентів в прототипі пропонуються D-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, коренища куркуми, квіток арніки гірської, трави чистотілу, ромашки, горечавки і сангвінарії.

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

В основу корисної моделі поставлене завдання створення нового способу отримання каротинвмісних ліпофільних комплексів та нових природних продуктів, одержаних за таким способом. Передбачувана корисна модель завдяки неочевидному використанню ефірних олій для екстракції з водної фази біомаси міководорості *Dunaliella salina* у сукупності з іншими заявленими параметрами способу повністю виключає використання неприродних компонентів при здійсненні корисної моделі і дозволяє одержати принаймні 3 природних продукти, зокрема, природний кристалічний бета-каротин з виходом понад 96-98% від його вмісту в вихідній сировині.

Поставлене завдання вирішується таким чином, що у способі отримання каротинвмісних ліпофільних компонентів шляхом екстракції природної сировини ефірними оліями гомогенного складу з чистотою не менше 98%, що включає відокрем-

лення екстракту від сировини, видалення екстрагенту з екстракту та очищення останнього, корисною моделлю передбачено, що екстракції піддають дисперговану в ропі біомасу міководорості *Dunaliella salina*, екстракцію проводять ефірною олією, вибраною з цінеолу, альфа-пінену, D-лімонену, при об'ємному співвідношенні екстрагента до сировини 1:2-1:3 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 екстракцію здійснюють при перемішуванні протягом 20-60 хвилин.

У відповідності з корисною моделлю розділення фаз екстрагенту та проекстрагованої біомаси міководорості *Dunaliella salina* здійснюють неочевидним оригінальним чином, а саме, досягають шляхом відстоювання при температурі 45-55°C, переважно 55°C, протягом 2-3 хвилин. Проте заявлений спосіб не виключає здійснення цього процесу шляхом центрифугування при понад 1000g протягом не менше 2 хвилин 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 20-60 хвилин.

Корисною моделлю передбачені можливі варіанти здійснення заявленого способу, а саме лужному гідролізу піддають при необхідності біомасу міководорості *Dunaliella salina* 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 проекстрагованій біомасі міководорості *Dunaliella salina*, або іншим придатним чином.

Згідно з корисною моделлю видалення екстрагенту з екстракту здійснюють під вакуумом при залишковому тиску 5-10 мм рт. ст. і температурі 35-45°C. Продукт у вигляді екстракту з вмістом екстрагенту являє собою каротинвмісний ліпофільний комплекс і містить розчин в природній ефірній олії, не менше 0,22% природного комплексу каротиноїдів (бета-каротин - не менше 0,2%, інші природні каротиноїди - не більше 0,02%), не більше 0,25% природних жирних кислот та їх гліцеридів, не більше 0,04% фосфоліпідів, не більше 0,25% фітостеринів, не більше 0,02% хлорофілу та не менше 0,08% токоферолу, і може бути використаний для зовнішнього застосування у медицині, ветеринарії, косметології. Також можливо одержання іншого

каротинвміщуючого лінофільного комплексу, а саме продукту у вигляді екстракту після видалення екстрагенту, який містить сліди природної ефірної олії, не менше 26% природного комплексу каротиноїдів (бета-каротину - не менше 24%, альфа-каротину - не більше 1%, лютеїну - не більше 0,2%), інших природних каротиноїдів - не більше 0,8%), не більше 30% природних жирних кислот і їх гліцеридів, не більше 5% фосфолінідів, не більше 30% фітостеринів, не більше 2% хлорофілу, не менше 8% токоферолу, і може бути використаний в якості харчової або кормової добавки.

Корисна модель забезпечує промислово доцільне одержання з використанням лише натуральних реагентів продукту у вигляді природного кристалічного бета-каротину, який містить бета-каротину (сума транс- і цис-ізомерів) не менше 93%, альфа-каротину - не більше 4%, лютеїну - не більше 1%, інших природних каротиноїдів - не більше 2%.

Згідно з заявленим способом як вихідну сировину використовують дисперговану в ропі біомасу мікроводорості *Dunaliella salina*, при цьому її концентрація може варіюватися у досить широких межах: від значень вмісту *Dunaliella salina* у ропі природних водоймищ до біомаси мікроводорості, сконцентрованої в природному розсолі будь-яким відомим способом: флотацією, фільтрацією (в тому числі мембранною), центрифугуванням, флокуляцією, коагуляцією або комбінацією цих підходів.

Дана мікроводорість суттєво відрізняється від іншої рослинної сировини відсутністю целюлози, високим вмістом ліпідів, а також тим, що сировина мікроводорості добувається у вигляді концентрату біомаси в природному висококонцентрованому розсолі - ропі. Все це визначає особливості використання ефірних олій як екстрагентів для біомаси мікроводорості і подальшої обробки екстракту з метою отримання природного комплексу ліпофільних біологічно активних речовин або очищеного бета-каротину з екстракту, заявлені у корисній моделі.

Як натуральний розчинник в даній корисній моделі пропонується використати природні ефірні олії, що отримуються з рослинної сировини відгонкою з водяною парою (тобто, в свою чергу, також без використання синтетичних розчинників). Будучи, як і каротиноїди, терпеноїдами за хімічною структурою, природні ефірні олії мають максимальну розчинювальну здатність по відношенню до каротиноїдів, що дозволяє отримати досить концентровані розчини каротиноїдів (до 30г/л в залежності від природи ефірного масла і каротиноїда).

Безперечною перевагою ефірних олій є їх практично повна нерозчинність у воді і низька летючість при температурах навколишнього середовища, що мінімізує втрати розчинника в процесі екстракції. Ефірні олії в порівнянні з більшістю інших розчинників не є горючими і токсичними і не вимагають особливих обережностей при роботі з ними.

У ході експериментів було помічено, що обробка ефірною олією ропи, що містить мікроводорість *Dunaliella salina*, сама по собі приводить до

коагулювання і концентрування біомаси. Цей факт є неочевидним і новим. Серед декількох перевірених на даній стадії розчинників (етилацетат, гексан, нефрас, цінеол, альфа-пінен, D-лімонен, м'ятне масло) тільки при використанні ефірних олій досягається повнота екстракції бета-каротину і інших каротиноїдів порядку 95-100%, а також може бути досягнуто досить швидке розділення фаз екстракту пігментів в ефірній олії, проекстрагованої біомаси і ропи. Оптимальне співвідношення об'ємів екстрагенту до сировини становить 1:2-1:3.

Розділення фаз екстракту, проекстрагованої біомаси і відпрацьованої ропи відбувається при відстоюванні і може бути прискорене центрифугуванням, або, що також було виявлено уперше, нагріванням до 40-45°C. Відповідно до заявленого способу фазу екстракту може бути відділено відстоюванням при температурі навколишнього середовища, або при нагріванні до 40-45°C, або центрифугуванням мінімум при 1000g протягом 2 хвилин мінімум або фільтрацією.

Багаторазова екстракція свіжих порцій біомаси однією і тією ж порцією ефірної олії дозволяє, за рахунок високої розчинності каротиноїдів в ефірних оліях, досягнути досить високої концентрації каротиноїдів в екстракті - до 12г/л.

Одержаний за заявленим способом продукт у вигляді екстракту з вмістом ефірної олії (екстрагенту) крім природного комплексу каротиноїдів містить ще і комплекс інших ліпофільних речовин, серед яких жирні кислоти і їх гліцериди, фосфоліпиди, фітостерини, хлорофіл, токоферол, і являє собою вже готовий галеновий препарат для зовнішнього застосування в медицині і косметології. Присутність ефірної олії в препараті сприяє кращому транспорту біологічно активних речовин препарату через шкіряні покриви. Проекстрагована біомаса після видалення ефірної олії відгонкою під вакуумом може використовуватися як білковий корм для тварин.

Екстракт може бути використаний для виділення кристалічного бета-каротину.

Одним з підходів до отримання чистих речовин природного походження є їх кристалізація з екстрактів при випаровуванні розчинників. Оптимальними для цих цілей є розчинники гомогенної природи, що мають певну точку кипіння, тобто, однорідний хімічний склад. Такий розчинник може бути багато разів використаний у виробничому циклі екстракції і випаровування. Крім того, використання розчинника з добре охарактеризованим однорідним складом гарантує незмінність якісного і кількісного складу екстракту. Серед природних ефірних олій найбільшою однорідністю складу характеризуються ефірна олія цитрусових (містить переважно D-лімонен), евкаліптова олія (містить переважно цінеол), ефірна олія хвойних - скипидар (містить переважно альфа-пінен). Вимозі однорідності складу не відповідає, на жаль, м'ятне масло, що має максимальну розчинювальну здатність по відношенню до каротиноїдів - до декількох десятків г/л. Попередньою перегонкою цитрусової олії, евкаліптової олії і скипидару можна отримати відповідно D-лімонен, пінеол і альфа-пінен з чистотою 98%. Крім того, попередня перегонка дозво-

ляє очистити екстрагент від перекисів, які можуть окислювати каротиноїди.

Відповідно до даної корисної моделі, отримують продукт у вигляді каротинвмісного лінофільного комплексу після видалення екстрагента з екстракту шляхом відгонки ефірної олії під вакуумом. Оскільки ефірні олії є висококиплячими сполуками, а каротиноїди чутливі до нагрівання, відгонку ефірних олій ведуть при залишковому тиску 5-10 мм рт. ст., краще 5 мм рт. ст., що дозволяє підтримувати температуру процесу в діапазоні 35-45°C.

Після повного випаровування ефірної олії в розчині відбувається кристалізація бета-каротину. Одержані кристали відфільтровують з використанням нутч- або друк-фільтрів, промивають етиловим спиртом і висушують в струмі інертного газу (азоту). Вихід бета-каротину в кристалічній формі з неочищеного екстракту становить 15-20%.

Фільтрат, що містить бета-каротин і концентрат інших ліпофільних біологічно активних речовин, може використовуватися як харчова і кормова добавка, а також для отримання розчинів бета-каротину в рослинних оліях для застосування в харчовій промисловості як харчовий барвник і вітамінізуючі добавки в різні харчові продукти: вершкове масло, маргарин, хлібобулочні вироби тощо.

Вихід кристалічного бета-каротину може бути збільшений до 96-98% при очищенні екстракту від основної маси ліпідів, що омилюються і хлорофілів шляхом лужного гідролізу. Унікальне поєднання властивостей біомаси *Dunaliella salina* і ефірних олій як екстрагентів дозволяє запропонувати декілька варіантів очищення екстракту від цих речовин на будь-якому етапі технологічного процесу: перед екстракцією, під час екстракції, після завершення екстракції, на будь-якому етапі концентрування екстракту відгонкою ефірної олії, після повної відгонки ефірної олії з екстракту. Ці властивості наступні: біомаса мікроводорості *Dunaliella salina* диспергована у водному середовищі і не вимагає обов'язкового попереднього подрібнення або екстракції перед обробкою водним розчином луку, ефірні олії інертні по відношенню до лугів і процес лужного гідролізу може вестися в середовищі ефірної олії.

Видалення омилюваних ліпідів і хлорофілів здійснюється за рахунок послідовного проведення наступних процесів: обробки лугом і видалення продуктів омилювання. Для лужної обробки відповідно до даної корисної моделі пропонується використати гідроксиди натрію, калію і кальцію, які дозволені для харчового застосування, як ті, що не чинять шкідливого впливу на здоров'я людини (харчові добавки H524, E525, E526), у вигляді твердих речовин, водних або спиртових розчинів, в залежності від стадії технологічного процесу, на якій ведеться омилювання. Експериментальним шляхом визначено, що процес омилювання доцільно проводити при інтенсивному перемішуванні, температурі 45-55°C, рН не менше за 12 протягом 20-60 хвилин.

Для подальшого видалення продуктів омилення, в залежності від стадії технологічного процесу, пропонується використати відмивання водою, во-

дно-спиртовими розчинами і спиртами (метанолом, етанолом, ізопропанолом), осадження з іонами кальцію, сорбцію на різних сорбентах (оксид алюмінію, магнетит, силікагель, кізельгур, діатоміт, перліт та інш.). Перевага, відповідно до даної корисної моделі, надається харчовим реагентам: етиловому спирту, хлориду кальцію (харчова добавка H509) і сорбентам на основі діоксиду кремнію (харчова добавка E551).

Новим і неочевидним в даній корисній моделі є той факт, що як сорбент для скріплення продуктів омилення може служити сама проекстрагована біомаса мікроводорості *Dunaliella salina*. Такий сорбент не вимагає регенерації; проекстрагована біомаса, що містить солі жирних кислот (мила), може надалі використовуватися як сировина для отримання біопалива.

Як варіант, проведення очищення до початку екстракції, відповідно до даної корисної моделі, до біомаси мікроводорості *Dunaliella salina* додається насичений (50%) розчин NaOH або KOH з розрахунку 20-25% від об'єму біомаси. Суміш нагрівають до 45-55°C і перемішують, підтримуючи цю температуру протягом 20-60 хвилин. рН суміші протягом всього процесу омилення повинна складати не менше за 12 (контролюється за допомогою індикаторного паперу).

Повнота омилювання може бути проконтрольована шляхом екстракції невеликого об'єму обробленої лугом біомаси етилацетатом. Пробу біомаси необхідно заздалегідь відмити від залишків лугу водою, оскільки етилацетат чутливий до дії луку і сам зазнає гідролізу на етиловий спирт і оцтову кислоту. Одержаний екстракт виливають на часове скло і дають випаруватися розчиннику на повітрі. При мікроскопії препарата на часовому склі повинні бути видні в масі кристали темно-червоного кольору і правильної ромбічної або гексагональної форми. Кристаличній домішці іншого кольору і форми повинні бути відсутніми. Якщо проба незадовільна, нагрівання і перемішування суміші продовжують, при необхідності доводячи її рН до 12 доданням 50% розчину луку до отримання задовільного результату.

Після завершення процесу очищення біомаси до неї доливають ефірну олію у відношенні 1 об'єм ефірної олії до 2-3 об'ємів концентрату біомаси і екстракують при перемішуванні до того, як тверда фаза набуде зеленуватого забарвлення. Процес екстракції займає порядку 60 хвилин. Суміш відстоюють, фазу ефірної олії рубіново-вишневого кольору декантують і відганяють ефірну олію при залишковому тиску 5-10 мм рт. ст., краще 5 мм рт. ст. і температурі 35-45°C до кристалізації бета-каротину. Кристали відфільтровують, промивають етиловим спиртом і висушують.

Як варіант, при проведенні лужного гідролізу на етапі екстракції, відповідно до даної корисної моделі, до біомаси одночасно додається насичений розчин NaOH або KOH з розрахунку 20-25% від її об'єму і ефірна олія у відношенні 1 об'єм ефірної олії до 2-3 об'ємів біомаси. Суміш нагрівають до 45-55°C і перемішують, підтримуючи цю температуру протягом 20 хвилин. Новим і неочевидним є той факт, що при одночасному прове-

денні процесів омилювання і екстракції каротиноїди переходять в екстракт так само швидко, як і при екстракції з сухої біомаси. Даний варіант здійснення способу є кращим.

Як варіант проведення очищення вміщуючого екстрагент екстракту, відповідно до даної корисної моделі, в екстракт може вводитися твердий або у вигляді насиченого розчину в спирті NaOH або KOH у меншій кількості з розрахунку 10% лугу від об'єму екстракту, що містить до 2г/л бета-каротину або твердого  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  з розрахунку 20% від об'єму екстракту, що містить до 2г/л бета-каротину. Дані концентрації лугу вибрані з невеликим надлишком. Можливо зменшити витрату лугу за рахунок точного дозування за заздалегідь визначеним числом омилення кожної порції екстракту. Суміш нагрівають до 45-55°C і перемішують, підтримуючи цю температуру протягом 20 хвилин. У разі використання гідроксиду кальцію після відстоювання суміші рубіново-вишневу фазу ефірної олії декантують і направляють на відгонку розчинника і кристалізацію, яку проводять, як описано вище, а осад  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , що не прореагував, твердих кальцієвих мил і сполук продуктів омилення хлорофілу з кальцієм відкидають. У разі використання NaOH або KOH екстракт також декантують з осаду не прореагувавшего лугу, який може використовуватися для омилення наступної порції екстракту. При використанні цих реагентів утворюються розчинні в ефірній олії натрієві або калієві мила і продукти омилення хлорофілу, які необхідно видалити з фази ефірної олії перед кристалізацією бета-каротину.

Видалення продуктів омилення на даному етапі може бути проведене декількома способами.

По-перше, екстракт може бути промитий спиртом або водно-спиртовою сумішшю (співвідношення вода - спирт не більше за 1:1, щоб забезпечити подальшу ефективну регенерацію спирту). Промивка ведеться декількома рівними об'ємами екстракту, що промивається, об'ємами спирту або водно-спиртової суміші, які додають до екстракту і перемішують. Потім суміші дають відстоятися і верхню фазу ефірної олії відділяють. Промивки припиняють, коли фаза ефірної олії набуває рубіново-вишневого забарвлення, а промивна фаза стає прозорою і безбарвною.

По-друге, розчинні натрієві або калієві мила і продукти омилення хлорофілу можуть бути переведені в осад шляхом перемішування фази ефірного олії після омилення з насиченим розчином кальцієвої солі, наприклад, хлорида кальцію, взятого у відношенні 1/10 від об'єму екстракту. Після перемішування суміш відстоюють, прозору фазу ефірної олії декантують, а водну фазу з осадом кальцієвих мил і сполук хлорофілу відкидають. На даному етапі теоретично можуть бути використані і солі інших металів, утворюючи нерозчинні осади з жирними кислотами і продуктами омилення хлорофілу, наприклад, солі цинку, але тільки кальцієві солі є нешкідливими і дозволеними до застосування в продуктах харчування.

По-третє, екстракт може бути пропущений через колонку, заповнену сорбентом (оксидом алюмінію, заліза, кремнію і інш.). При ньому мила і

продукти омилення хлорофілу залишаються на колонці.

Як повнота омилення екстракту, так і повнота видалення продуктів омилення з екстракту, можуть бути проконтрольовані простим і досить швидким в здійсненні способом. Для цього відбирають аліквоту омиленого і очищеного від продуктів омилення екстракту і нагрівають її, перемішуючи з невеликою кількістю сухого NaOH або KOH, при 45-55°C протягом 20 хвилин. Після цього пробу відстоюють і зливають з осаду лугу. Якщо при доданні насиченого розчину  $\text{CaCl}_2$  і перемішуванні проби не випадає зеленуватий або білуватий осад, процес омилення пройшов повністю, продукти омилення з екстракту видалені. Якщо проба незадовільна, процес продовжують до отримання задовільної проби, при необхідності, додаючи в реакційну суміш луг.

Очищений від продуктів омилення будь-яким з можливих способів екстракт спрямовується на відгонку ефірної олії і кристалізацію бета-каротину, яку здійснюють як описано вище.

Екстракт перед омиленням може бути сконцентрований шляхом відгонки ефірної олії, однак при концентрації бета-каротину понад 2г/л процес омилення утруднений і вимагає більшого часу (до 60 хвилин), мабуть, в зв'язку з утворенням в концентрованому розчині ліпідних міцел і їх стабілізації милами, що утворюються. Значно швидше проходить омилення, якщо ефірну олію повністю відігнано з екстракту і він являє собою гомогенну систему - розчин бета-каротину в ліпідах.

У варіанті очищення вільного від екстрагенту екстракту омилювання проводять 50% водним розчином NaOH або KOH взятим в об'ємі, рівному половині об'єму концентрата. До нагрітого до 45-55°C концентрату ліпофільних речовин, що має маслоподібну консистенцію, при перемішуванні доливають розчин лугу і продовжують перемішувати при тій же температурі протягом 60 хвилин. Потім суміші дають охолонути до температури 25-30°C. При охолодженні в суміші формуються кристали бета-каротину, появлення яких контролюється під мікроскопом. Кристали повинні мати правильну форму від ромбічної до гексагональної і темно-червоного колір. Кристали оточені коричнюватою рідиною, яка містить воду, гліцерин, мила і продукти омилення хлорофілів, які можуть бути відмиті водою. Якщо при мікроскопуванні не виявляються кристали або вони мають інший вигляд, процес повторюють до отримання задовільного результату. Потім суміш фільтрують, відфільтровані кристали декілька разів промивають водою, потім етиловим спиртом і висушують.

Всі запропоновані варіанти способу одержання максимально можливого виходу кристалічного бета-каротину з мікроводорості *Dunaliella salina* при дотриманні технологічних умов дозволяють одержувати вихід на рівні 96-98% від початкового вмісту бета-каротину в біомасі.

Одержаний продукт у вигляді кристалічного бета-каротину має наступний склад: бета-каротин (сума транс і цис-ізомерів) не менше 93%, альфа-каротин - не більше 4%, лютеїн - не більше 1%, інші природні каротиноїди - не більше 1%. Присут-

ність інших каротиноїдів, крім бета-каротину, є маркером природного рослинного походження цього продукту, а також потенціє антиоксидантну активність бета-каротину. Важливо, що продукт задовільної чистоти відповідно заявленого способу може бути одержаний без додаткової стадії перекристалізації, витрат розчинників та втрати частки цільового продукту.

Вибір варіанту заявленого способу здійснюється на основі обладнання, що є наявним, і доступних реагентів. Для всіх варіантів способу розроблені прості тести, що дозволяють контролювати хід процесу видалення омилюваних ліпофільних компонентів. Технологія є безвідходною: ефірна олія відганяється під вакуумом і використовується багато разів, промивний спирт регенерується перегонкою, біомаса після екстракції або омилення може використовуватися як білковий корм або сировина для отримання біопалива. Всі реагенти, що використовуються, дозволені для застосування в харчовій промисловості і являють собою природні сполуки, нешкідливі для персоналу і навколишнього середовища.

Заявлений спосіб ілюструється прикладом.

Приклад 1. До 5л концентрату біомаси *Dunaliella salina*, отриманого методом флотації, з концентрацією бета-каротину 150мг/л, підігрітому до 55°C, при перемішуванні одночасно доливали 1л 50% водного розчину NaOH і 2,5л альфа-пінена. Суміш перемішували при температурі 55°C протягом 20 хвилин, після чого давали їй відстоятися. Спостерігали розділення фаз: верхня фаза являла собою рубіново-вишневий екстракт, нижня - зеленувату суспензію біомаси в прозорій ропі. Екстракт декантували. Концентрація бета-каротину в екстракті становила 300мг/л. Екстракт випаровували на вакуумному ротаційному випар-

нику при залишковому тиску 5мм рт.ст. і температурі 35°C до об'єму концентрата 3-5мл. Отриману рідину темно-вишневого кольору фільтрували під вакуумом через воронку Бюхнера із заправленою в неї металевою сіткою з розміром пір 6мкм. Фільтрат з колби Бунзена переливали на часове скло і довипаровували у вакуумній шафі 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. Кристалічний осад знімали з фільтра і зважували. Його маса становила 628мг. Маса осаду на часовому склі становила 100мг. Загальний вихід кристалів становив 97% від вмісту бета-каротину в вихідному концентраті біомаси.

Аналіз складу кристалів одержаного продукту - природного бета-каротину за допомогою ВЭЖХ на колонці Nucleosil C 18 150×4,6мм, 5мкм показав наступне: бета-каротин (сума транс і цис-ізомерів) - 94,5%, альфа-каротин - 4,0%, лютеїн - 0,5%, інші природні каротиноїди - 1,0%.

Таким чином, заявлено новий спосіб одержання каротинвміщуючих ліпофільних комплексів з біомаси мікроводорості *Dunaliella salina* шляхом екстракції очищеними ефірними оліями гомогенного складу. За заявленим способом можуть бути одержані з економічно доцільним виходом принаймні три натуральних продукти, вміщуючи каротиноїди та інші біологічно активні речовини ліофільної природи, зокрема природний 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.