

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 520**

51 Int. Cl.:

C07C 403/24	(2006.01)	A61K 8/99	(2006.01)
A23L 1/30	(2006.01)	A61K 35/74	(2015.01)
A61K 8/35	(2006.01)	C12N 15/01	(2006.01)
A61K 31/122	(2006.01)	A23L 1/303	(2006.01)
A61P 17/18	(2006.01)	A23L 1/275	(2006.01)
A61P 39/06	(2006.01)		
A61Q 19/00	(2006.01)		
B01D 11/02	(2006.01)		
C09B 61/00	(2006.01)		
C12P 23/00	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2007 E 07740954 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2015 EP 2017262**

54 Título: **Proceso para la producción de carotenoides**

30 Prioridad:

28.03.2006 JP 2006087223
30.05.2006 JP 2006149794

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.10.2015

73 Titular/es:

NIPPON OIL CORPORATION (100.0%)
3-12, NISHI-SHIMBASHI 1-CHOME, MINATO-KU
TOKYO 105-8412, JP

72 Inventor/es:

ISHIZAKI, TOMOYUKI;
ISHIKAWA, SATORU;
TSUBOKURA, AKIRA y
HIRASAWA, KAZUAKI

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 548 520 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proceso para la producción de carotenoides

5 Campo de la técnica

La presente invención se refiere a un método para producir carotenoides, y en particular a un método adecuado industrialmente para producir astaxantina que se pueda utilizar como un componente de alimentos, composiciones farmacéuticas o cosméticos. La presente invención también se refiere a una composición que contiene carotenoides que se obtiene por tal método; y un alimento, una composición farmacéutica y una sustancia cosmética que comprende tal composición que contiene carotenoides.

Técnica antecedente

El carotenoide es un pigmento natural extendido ampliamente en la naturaleza, y es un pigmento poliénico que tiene un color en el intervalo del amarillo al rojo o púrpura. La astaxantina es un tipo de carotenoide y existe en estado libre o como un éster, o existe como varios tipos de proteínas pigmentarias como resultado de la unión con las mismas.

La astaxantina se utiliza ampliamente como agente colorante para pescados y huevos de gallina. La astaxantina también está permitida para su uso como un aditivo alimentario y se utiliza ampliamente en alimentos procesados oleosos y grasos, alimentos proteicos, alimentos líquidos acuosos y similares. La astaxantina tiene además una actividad antioxidante contra la peroxidación de lípidos excitados por un radical libre, una acción de eliminación de singlete de oxígeno, que puede ser varios cientos de veces más fuerte que la del α -tocoferol o similares, y por lo tanto se espera que se utilice en alimentos funcionales, cosméticos, y fármacos farmacéuticos utilizando la fuerte actividad anti-oxidante de la misma.

La astaxantina se distribuye ampliamente en la naturaleza, por ejemplo, en pescados tales como el salmón, trucha y palometa roja marina, etc.; y en crustáceos tales como cangrejos, gambas, krill, etc. La astaxantina también se produce en bacterias que pertenecen a los Agrobacterium, Brevibacterium y Paracoccus; y microorganismos que incluyen Haematococcus pluvialis, levadura Phaffia y similares. Los carotenoides tales como astaxantina, zeaxantina o similares se producen industrialmente por un método de síntesis química, pero se desean los carotenoides de origen natural desde el aspecto de la seguridad.

Con tal antecedente, se han expuesto muchos métodos para producir carotenoides que contienen astaxantina derivados especialmente de algas o microorganismos que se consideran adecuados para la producción en masa.

Por ejemplo, se han expuesto muchos métodos para producir carotenoides que contienen astaxantina a partir de un alga Haematococcus (documento 1). Un cistocito de un alga post-cultivo se trata con acetona calentada para eluir la clorofila, que es un contaminante. Luego, el cistocito se seca por pulverización, y se extrae el carotenoide de las células secas resultantes con etanol. Sin embargo, una composición que se obtenga por tal método sigue conteniendo muchos contaminantes derivados de los organismos, y no es satisfactorio en términos de 1) contenido de carotenoides, 2) contenido de astaxantina y similares.

Con el fin de obtener una composición que comprenda astaxantina con un alto contenido, por ejemplo, se ha expuesto el siguiente método (documento 2). Se deja actuar lipasa sobre xantófitos en bruto obtenidos conforme el método descrito anteriormente en presencia de agua para descomponer un lípido neutro, que es un contaminante, el líquido tratado con la enzima lipasa se descompone en aceite y agua. A partir de la capa de aceite separada, los ácidos grasos libres se separan de la astaxantina por destilación, y la astaxantina se concentra y purifica. Sin embargo, incluso tras tales complicadas etapas de tratamiento, no se ha obtenido una composición que contenga astaxantina con una tasa del 30 % o más alta.

Se ha expuesto un método de obtención de astaxantina contenida con una proporción del 0,5 al 60 % utilizando un método de extracción en fluido supercrítico (documento 3). Sin embargo, es inevitable que se produzca como sub-producto una fracción de astaxantina con un contenido menor que el contenido objetivo. Con el fin de desecharla, o aumentar el contenido de astaxantina de tal fracción, se necesita otra operación de concentración. Por lo tanto, este método de producción no es satisfactorio, en términos de simplicidad y coste, como método industrial para producir un carotenoide altamente puro que contenga un alto contenido de astaxantina con pocos contaminantes derivados de los organismos.

Se ha expuesto como un método que utiliza la levadura Phaffia el siguiente método (documento 4). Una célula de levadura machacada se trata por extracción utilizando un disolvente orgánico, y el extracto en bruto de tipo oleoso, que se obtiene concentrando la solución del extracto, se purifica por cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de adsorción o similares para obtener la astaxantina. Sin embargo, este método se lleva a cabo por una técnica de purificación no industrial de la solución en bruto de baja concentración de astaxantina por medio de una pluralidad de tipos de cromatografía en columna.

- 5 Como otro método, también se ha expuesto el siguiente método (documento 5). Se trata una célula bacteriana tras el cultivo de levadura *Phaffia* por extracción utilizando acetona, y el extracto resultante se concentra para obtener una sustancia bruta tipo oleoso. Se añade un disolvente basado en un hidrocarburo a esta sustancia tipo oleosa para que se depositen cristales. Este método es muy simple, pero la composición que se obtiene contiene carotenoides con un contenido solo del 70 a 73 % (el contenido de astaxantina es solo del 36 al 42 %). Debido a tal bajo contenido, este método no es satisfactorio como método para producir un carotenoide altamente puro con pocos contaminantes derivados de organismos. Este método tampoco es satisfactorio por la razón de que hay un problema con que la acetona y el disolvente basado en un hidrocarburo pueden permanecer en el carotenoide.
- 10 Como métodos que utilizan la cepa E-396 (FERMI BP-4283: depositada el 27 de abril de 1993 (fecha del depósito original), Depositario de Organismos de Patente Internacional, Instituto Nacional de Ciencia Industrial y Tecnología Avanzadas (Central 6, Higuchi 1-1-1, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japón)), que es una bacteria para producir astaxantina, adonixantina y similares, se han expuesto los siguientes métodos: un método de extracción poniendo en contacto un compuesto orgánico hidrófilo cíclico, que aplica un problema de seguridad con respecto a su uso en producción alimentaria, con la célula bacteriana (documento 6); y un método que utiliza el método de extracción en fluido supercrítico como en el documento 3 (documento 7). También se ha expuesto un método para poner en contacto la cepa E-396 con un disolvente orgánico soluble en agua, un disolvente no polar y agua para llevar a cabo una extracción líquido-líquido (documento 8).
- 15
- 20 Bajo estas circunstancias, existe un fuerte deseo de un método para producir industrialmente un carotenoide altamente puro que contenga astaxantina con un alto contenido, que sea simple y no necesite de instalaciones especiales o complicadas operaciones y que utilice un disolvente seguro para la producción de alimentos.

Documentos de referencia

- 25 Documento 1: Publicación de Patente abierta a inspección N° H 11-56346
 Documento 2: Publicación de Patente abierta a inspección N° 2002-218994
 Documento 3: Publicación de Patente abierta a inspección N° 2004-41147
 Documento 4: Publicación de Patente abierta a inspección N° H 10-276721
 Documento 5: Publicación de Patente abierta a inspección N° 2004-208504
 Documento 6: Publicación de Patente abierta a inspección N° H 7-242621
 Documento 7: Publicación de Patente abierta a inspección N° H 8-89280
 Documento 8: Publicación de Patente abierta a inspección N° H 8-253695
- 30

35 **Divulgación de la invención**

La presente invención tiene como objetivo proporcionar un método para producir industrialmente una composición que contiene un carotenoide altamente puro y con alto contenido utilizando un disolvente seguro y de bajo coste.

- 40 Con el fin de resolver los problemas descritos anteriormente, la presente invención lleva a cabo una investigación principalmente sobre cultivos de organismos. Como resultado, los presentes inventores encuentran de manera novedosa los siguientes problemas en una técnica convencional para obtener carotenoides altamente puros por extracción en líquido-líquido: 1) es ineficaz industrialmente como técnica convencional para intentar realizar la purificación de alto nivel en el estado en el que la concentración de la solución es baja, debido a que se necesitan muchos tipos de soluciones en las etapas de purificación; 2) no es simple debido a que se necesita la recuperación del disolvente que se incluye en el fraccionamiento a partir de una mezcla de disolventes orgánicos; y 3) es baja en seguridad debido a que los disolventes que se utilizan permanecen en el producto final. Como resultado de la acumulación de activos estudios adicionales con el fin de resolver también estos problemas encontrados recientemente, los presentes inventores descubren la siguiente y completan la presente invención. Se obtiene una composición de carotenoide altamente puro llevando a cabo la extracción en un cultivo de un microorganismo que contienen carotenoides, un concentrado del mismo, o una sustancia seca del mismo, con un alcohol inferior, y lavando el precipitado que se obtiene concentrando la solución del extracto, con un alcohol inferior que contiene agua o una combinación de alcohol inferior que contiene agua y un disolvente basado en un hidrocarburo.
- 45
- 50 Los presentes inventores también descubrieron lo siguiente y completaron la presente invención. Se obtiene una composición de carotenoide altamente puro llevando a cabo la extracción en un cultivo de un microorganismo con al menos uno de una dialquilcetona inferior y un éter, y lavando el precipitado que se obtiene concentrando la solución del extracto, con al menos uno de un alcohol inferior y una dialquilcetona inferior, o con una mezcla en solución de los mismos.
- 55

60 La presente invención tiene la siguiente estructura.

- (1) Un método para producir una composición que contiene carotenoides, que comprende las siguientes etapas 1) a 3):
- 65

- 1) llevar a cabo la extracción en un cultivo de un microorganismo, un concentrado del cultivo, o una sustancia seca del mismo con al menos uno que se selecciona de entre el grupo que consiste en alcoholes inferiores, dialquilonas inferiores y éteres, como se define en las reivindicaciones;
- 5 2) concentrar la solución del extracto obtenido para obtener un precipitado; y
3) lavar el precipitado con al menos uno que se selecciona de entre el grupo que consiste en alcoholes inferiores, alcoholes inferiores que contienen agua, y dialquilonas inferiores, como se define en las reivindicaciones.
- (2) Un método para producir una composición que contiene carotenoides, que comprende las siguientes etapas 1) a 3):
- 10 1) llevar a cabo la extracción en un cultivo de un microorganismo, un concentrado del cultivo, o una sustancia seca del mismo con etanol o acetona;
2) concentrar la solución del extracto obtenida para obtener un precipitado; y
15 3) lavar el precipitado con etanol, etanol que contiene agua o acetona.
- (3) Un método para producir una composición que contiene carotenoides, que comprende las siguientes etapas 1) a 3):
- 20 1) llevar a cabo la extracción en un cultivo de un microorganismo, un concentrado del cultivo, o una sustancia seca del mismo con etanol;
2) concentrar la solución del extracto obtenida para obtener un precipitado; y
3) lavar el precipitado con etanol que contiene agua.
- (4) Un método para producir una composición que contiene carotenoides, que comprende las siguientes etapas 1) a 3):
- 25 1) llevar a cabo la extracción en un cultivo de un microorganismo, un concentrado del cultivo, o una sustancia seca del mismo con acetona;
30 2) concentrar la solución del extracto obtenida para obtener un precipitado; y
3) lavar el precipitado con etanol.
- (5) Un método para producir una composición que contiene carotenoides, que comprende las siguientes etapas 1) a 3):
- 35 1) llevar a cabo la extracción en un cultivo de un microorganismo, un concentrado del cultivo, o una sustancia seca del mismo con acetona;
2) concentrar la solución del extracto obtenida para obtener un precipitado; y
40 3) lavar el precipitado con acetona.
- (6) El método de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (5), que comprende además la siguiente etapa:
- 4) lavar además el precipitado obtenido en la etapa 3) con hexano.
- (7) El método de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (6), en el que la composición que contiene carotenoides contiene un 80 % o más de carotenoide.
- (8) El método de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (7), en el que el carotenoide contiene un 40 % o más de astaxantina.
- 50 (9) El método de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (8), en el que la secuencia de bases de ADN del microorganismo que corresponde al ARN 16S ribosómico es sustancialmente homólogo a la secuencia de bases representada en la SEC ID N° 1.
- 55 (10) El método de acuerdo con una cualquiera de (1) a (9), en el que el microorganismo es de la cepa E-396 (FERM BP-4283) o un mutante de la misma.

La presente invención puede proporcionar un método para producir industrialmente una composición que contiene, con un alto contenido, carotenoides de origen natural, altamente puros, seguro y a bajo coste. Las composiciones que contienen carotenoides pueden incorporarse en un alimento funcional, composición farmacéutica y una sustancia cosmética.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

65 De aquí en adelante, se describirán específicamente las realizaciones de la presente invención. La presente invención no se limita a la siguiente descripción, y se puede llevar a cabo con modificaciones adecuadas distintas de

las siguientes realizaciones ilustrativas sin alejarse del ámbito de la presente invención, como se define en las reivindicaciones.

5 La presente invención se refiere a un método para producir carotenoides, que se caracteriza por llevar a cabo la extracción en un cultivo de un microorganismo, etc., por ejemplo, un cultivo de un microorganismo que contiene carotenoides, etc. con al menos uno que se selecciona de entre el grupo que consiste en alcoholes inferiores, dialquilcetonas inferiores y éteres; y luego lavando un precipitado que se obtiene concentrando la solución del extracto, con al menos uno que se selecciona de entre el grupo que consiste en alcoholes inferiores, alcoholes inferiores que contienen agua, y dialquilcetonas inferiores. El método de acuerdo con la presente invención puede proporcionar una composición que contiene carotenoides que contienen astaxantina con un contenido del 80 % o más, preferentemente el 90 % o más, y que tiene pocos contaminantes derivados de organismos y muy poco contenido de disolventes orgánicos distintos de alcoholes inferiores.

15 Los microorganismos que se pueden utilizar en la presente invención incluyen, sin limitación, cualquier microorganismo capaz de producir carotenoides. Por ejemplo, se pueden utilizar bacterias *Paracoccus*, algas *Haematococcus*, levaduras *Phaffia* y similares. Desde el punto de vista de la velocidad y la productividad de carotenoides, se prefiere una bacteria, cuya secuencia de bases de ADN que corresponde con el ARN 16S ribosómico es sustancialmente homóloga a la secuencia de bases representada en la SEC ID N° 1 del listado de secuencias.

20 La expresión "sustancialmente homóloga" significa que estas secuencias tienen una homología del 94 % o más, preferentemente del 96 % o más, y más preferentemente del 98 % o más, considerando el error de frecuencia de la determinación de las secuencias de bases del ADN, las mutaciones naturales de los microorganismos y similares. Entre tales bacterias, se prefiere especialmente la cepa E-396 (FERM BP-4283). También es muy preferible el uso de una cepa altamente productiva de carotenoides, obteniéndose la cepa mutando estos microorganismos con el fin de mejorar la productividad de carotenoides. La cepa E-396 está depositada en el Depositario de Organismos de Patentes Internacional, Instituto Nacional de Ciencia Industrial y Tecnología Avanzadas de la siguiente manera:

30 Autoridad de Depósito Internacional: Depositario de Organismos de Patentes Internacional, Instituto Nacional de Ciencia Industrial y Tecnología Avanzadas (anteriormente Instituto Nacional de Biociencia y Tecnología Humana, Agencia de Ciencia Industrial y Tecnología, Ministerio de Comercio Internacional e Industria)
Central 6, Higashi 1-1-1, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566 Identificación N° E-396
Depósito N° FERM BP-4283
35 Fecha del depósito original: 27 de Abril de 1993

40 No hay una limitación específica en el método para producir un mutante siempre que el método induzca una mutación. Los métodos que se pueden utilizar incluyen, por ejemplo, un método químico que utiliza un agente mutante como la N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG), etilmetanosulfonato (EMS) o similares; un método físico que utiliza radiación ultravioleta, radiación con rayos x o similares; o un método genético que utiliza recombinación genética, transposón o similares. La mutación se puede llevar a cabo en una etapa, o en dos o más etapas. En el último caso, por ejemplo, se obtiene un microorganismo mutante que produce astaxantina por el proceso de mutación anterior, y luego el mutante que se obtiene se somete además a otro proceso de mutación.

45 Un cultivo de microorganismo, etc. que se puede utilizar para la presente invención puede ser cualquier cultivo, sin limitación específica, que se obtiene por un método capaz de cultivar eficazmente el microorganismo descrito anteriormente, por ejemplo, por un método de utilización de un cultivo líquido, cultivo sólido o una combinación de los mismos utilizando cualquiera de los siguientes medios.

50 Un medio de nutrición que se puede utilizar para cultivar un microorganismo que se utiliza para la presente invención puede ser cualquier medio de nutrición que contenga una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y una sal inorgánica necesaria para cultivar una bacteria productora. Puede ser más preferible añadir una vitamina. Puede ser preferible añadir además aminoácidos, bases de ácidos nucleicos o similares. Otras sustancias que se pueden añadir opcionalmente incluyen extracto de levadura, peptona, extracto de carne, extracto de malta, agua de macerado de maíz, levadura seca, aglutinado de soja y similares.

55 Las fuentes de carbono que se pueden utilizar incluyen azúcares tales como glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, trehalosa, manosa, manitol, maltosa y similares; ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido fumárico, ácido cítrico, ácido propiónico, ácido málico, ácido malónico, ácido pirúvico y similares; alcoholes tales como etanol, propanol, butanol, pentanol, hexanol, isobutanol, glicerol y similares; grasas y aceites tales como aceite de soja, aceite de salvado de arroz, aceite de oliva, aceite de maíz, aceite de linaza y similares; etc. Estas fuentes de carbono se pueden utilizar de manera independiente o en una combinación de dos o más. La relación de los mismos dependen del tipo de fuente de carbono y se puede ajustar apropiadamente, pero habitualmente es de 1 a 100 g, preferentemente 2 a 50 g, por 1 l de medio.

65 Las fuentes de nitrógeno que se pueden utilizar incluyen, por ejemplo, nitrato potásico, nitrato amónico, cloruro amónico, fosfato amónico, amoniaco, urea y similares. Estas fuentes de nitrógeno se pueden utilizar

independientemente o en una combinación de dos o más. La relación de los mismos depende del tipo de fuente de nitrógeno y se pueden ajustar apropiadamente, pero habitualmente es de 0,1 a 30 g, preferentemente de 1 a 10 g por 1 l de medio.

- 5 Las sales inorgánicas que se pueden utilizar incluyen fosfato potásico de dihidrógeno, fosfato dipotásico de hidrógeno, fosfato disódico hidrógeno, sulfato magnésico, cloruro magnésico, sulfato de hierro, sulfato de manganeso, cloruro de manganeso, sulfato de zinc, cloruro de plomo, sulfato de cobre, cloruro de calcio, carbonato de calcio, carbonato de sodio, y similares. Estas sales orgánicas se pueden utilizar independientemente o en una combinación de dos o más. La relación de las mismas depende del tipo de sal inorgánica y se puede ajustar apropiadamente, pero habitualmente es de 0,001 a 10 g por 1 litro de medio.

Cuando se añade una vitamina, la cantidad de la misma depende del tipo de vitamina y se puede ajustar apropiadamente, pero habitualmente es de 0,1 a 1000 mg, preferentemente 1 a 100 mg, por 1 l de medio.

- 15 La cantidad de cada aminoácido, base de ácido nucleico, extracto de levadura, peptona, extracto de carne, extracto de malta, agua de macerado de maíz, levadura seca, aglutinado de soja y similares depende del tipo de la sustancia y puede ajustarse apropiadamente, pero habitualmente es de 0,2 g a 200 g, preferentemente de 3 a 100 g, por 1 l de medio.

- 20 El pH del medio se ajusta de 2 a 12, preferentemente 6 a 9. El cultivo se lleva a cabo a una temperatura de 15 a 80 °C, preferentemente 20 a 35 °C, durante 1 a 20 días, preferentemente de 2 a 8 días, bajo condiciones aeróbicas. La condición aeróbica es, por ejemplo, un cultivo con agitado, aireación y cultivo removido, o similares.

- 25 Un método preferido para la extracción de la astaxantina producida por un microorganismo en un cultivo que se utiliza en la presente invención es la siguiente. Tras el cultivo, la solución del cultivo se trata por concentración por medio de una filtración por membrana para obtener una solución bacteriana concentrada, o se trata por centrifugación, presurización, filtración a presión reducida, o por otro cualquiera de los métodos que se conocen en general para obtener una célula bacteriana húmeda. La solución de células bacterianas concentradas o la célula bacteriana húmeda se trata por secado con atomización, secado fluidificado, secado por tambor rotatorio, liofilización o cualquier método de secado que se conozca en general para obtener una célula bacteriana seca. La célula bacteriana seca se trata por extracción con el siguiente método. También se recomienda que antes de llevar a cabo la extracción siguiente, la solución de cultivo, la solución de células bacterianas concentradas, la célula bacteriana húmeda o la célula bacteriana seca se trate con uno, o al menos uno, de un tratamiento químico utilizando un reactivo alcalino, un tensioactivo o similar; un tratamiento bioquímico utilizando una enzima bacteriolítica, una enzima de descomposición lipídica, una enzima proteolítica o similares; y un tratamiento físico utilizando ondas ultrasónicas, pulverización y similares. La célula bacteriana seca se considera habitualmente que contiene astaxantina en una proporción de aproximadamente 20 mg/g.

- 40 Un disolvente que se puede utilizar para la extracción a partir de un microorganismo cultivado (un cultivo de un microorganismo), un concentrado del cultivo o una sustancia seca del mismo (también denominado en el presente documento como "microorganismo cultivado, etc." o "cultivo de un microorganismo, etc.") que se utiliza en la presente invención (en el presente documento, tal disolvente se puede denominar "disolvente de extracción") puede ser uno cualquiera que se selecciona de entre el grupo que consiste en alcoholes inferiores, dialquilcetonas inferiores y éteres, o una combinación de los mismos.

- 45 Entre los alcoholes inferiores, la presente invención utiliza metanol, etanol, n-propanol o isopropanol; son más preferibles el etanol e isopropanol, y especialmente preferible el etanol.

- 50 La temperatura del disolvente para la extracción es más baja que el punto de ebullición del disolvente que se utilice, y es más preferentemente alrededor de una temperatura que esté aproximadamente 20 °C por debajo del punto de ebullición. Para el etanol, es preferible, de 25 °C a 60 °C, es más preferible de 40 °C a 55 °C, y aun es más preferible de 45 a 52 °C. La cantidad de disolvente de extracción puede ser cualquier cantidad con la que se pueda disolver la astaxantina que contiene la célula bacteriana. Por ejemplo, en el caso de la extracción de una célula bacteriana seca con etanol, la cantidad es de 1 a 90 kg, preferentemente de 6 a 20 kg, por cada gramo de astaxantina contenida en la célula bacteriana.

- 60 Por ejemplo, cuando la extracción se lleva a cabo con etanol a 50 °C en 1 g de células bacterianas secas, que contienen aproximadamente 20 mg de astaxantina, que se obtiene de un microorganismo cultivado, etc. mencionado anteriormente para su uso en la presente invención, la cantidad de etanol puede ser de aproximadamente 70 g a 1800 g, preferentemente de aproximadamente 150 g a 700 g, y más preferentemente aproximadamente 250 g a 500 g.

- 65 Las dialquilcetonas inferiores y los éteres que se pueden utilizar como disolvente de extracción de acuerdo con la presente invención son acetona, metiletilcetona y tetrahidrofurano: la acetona y tetrahidrofurano son más preferibles, y la acetona es especialmente preferible.

- La temperatura del disolvente para la extracción es, como anteriormente, preferentemente de 0 °C del punto de ebullición del disolvente que se utilice, y es más preferentemente alrededor de una temperatura que sea aproximadamente 5 °C menor que la temperatura de ebullición. Para la acetona, es preferible de 25 °C a 55 °C, es más preferible de 40 °C a 55 °C, y aún es más preferible de 45 °C a 52 °C. La cantidad el disolvente de extracción
- 5 puede ser cualquier cantidad en la que se pueda disolver la cantidad de astaxantina contenida en la célula bacteriana. Por ejemplo, en el caso de la extracción a partir de una célula bacteriana seca con acetona, la cantidad es de 0,2 a 18 kg, preferentemente de 0,9 a 3 kg, por 1 g de astaxantina contenida en la célula bacteriana.
- Por ejemplo, cuando se lleva a cabo la extracción con cetona a 50 °C a partir de 1 g de células bacterianas secas,
- 10 que contienen aproximadamente 20 mg de astaxantina, que se obtiene a partir de un microorganismo cultivado, etc. que se menciona anteriormente utilizado para la presente invención, la cantidad de acetona puede ser aproximadamente 7 g a 180 g, preferentemente aproximadamente de 15 g a 70 g, y más preferentemente aproximadamente 25 g a 50 g.
- 15 Cuando se desea suprimir la oxidación de los carotenoides durante la operación de extracción al nivel mínimo posible, la extracción se tiene que llevar a cabo bajo una atmósfera de gas inerte tal como el gas nitrógeno, o se puede seleccionar un antioxidante que se utilice en fármacos farmacéuticos o alimentos y añadirlo al disolvente de extracción. Estos tratamientos se pueden combinar.
- 20 Es preferible que se elimine el antioxidante de la composición de carotenoides al final, pero puede no ser necesaria la eliminación dependiendo del tipo de antioxidante que se utilice.
- No es necesario limitar el tiempo de extracción. Cuando la extracción se lleva a cabo a temperatura ambiente o más alta, es preferible un tiempo más corto con el fin de minimizar el descenso de rendimiento causado por la
- 25 descomposición térmica. Por ejemplo, para la extracción con etanol a 50 °C, es preferible en 12 horas, es más preferible en 8 horas, es aún más preferible en 6 horas, es especialmente preferible en 4 horas, y es más preferible en 3 horas. Para la extracción con acetona a 50 °C, es preferible en 12 horas, es más preferible en 6 horas, es aún más preferible en 3 horas, es especialmente preferible en 2 horas, y es más preferible en 1 hora.
- 30 Los métodos para concentrar la solución del extracto que se obtiene por la extracción a partir de un cultivo de un microorganismo, etc. con un alcohol inferior incluyen el calentamiento y/o la concentración a presión reducida. Cuando se desea suprimir la oxidación de los carotenoides durante la concentración a un nivel lo mínimo posible, la concentración se puede llevar a cabo bajo una atmósfera de gas inerte tal como el gas nitrógeno. El grado de
- 35 concentración se puede determinar apropiadamente considerando la cantidad y la pureza del precipitado que se va a obtener. Por ejemplo, la solución del extracto se puede concentrar 10 a 1000 veces, preferentemente de 30 a 500 veces, más preferentemente de 50 a 400 veces, y especialmente preferentemente de 100 a 200 veces, con respecto al peso de la misma.
- Los métodos para concentrar la solución del extracto que se obtiene por extracción a partir de un microorganismo cultivado, etc. con al menos uno de una dialquicetona inferior y un éter incluye el calentamiento y/o la concentración a presión reducida como anteriormente. Cuando se desea suprimir la oxidación de los carotenoides durante la
- 40 concentración a un nivel lo mínimo posible, la concentración se puede llevar a cabo bajo una atmósfera de gas inerte tal como el gas nitrógeno. El grado de concentración puede determinarse apropiadamente considerando la cantidad y pureza del precipitado que se va a obtener. Por ejemplo, la solución del extracto se puede concentrar de 3 a 100
- 45 veces, preferentemente de 7 a 50 veces, más preferentemente de 15 a 50 veces, y especialmente preferentemente de 20 a 30 veces, con respecto al peso del mismo.
- La solución que se retira concentrando la solución del extracto se puede reutilizar para la extracción a partir de un microorganismo cultivado, etc. sin tratamiento adicional.
- 50 La solución concentrada que se obtiene por la concentración se puede enfriar apropiadamente considerando la cantidad y pureza del precipitado que se va a obtener de forma que además promueve la precipitación. La temperatura de enfriamiento, por ejemplo, es una temperatura que es 20 °C o más, menor que en el momento de la extracción, o es de 5 °C, 0 °C, -5 °C, -10 °C o similares. Alternativamente, en algunas realizaciones, es más
- 55 preferible que el precipitado se obtenga parando la concentración inmediatamente antes de que se genere el precipitado, y luego se enfría apropiadamente la solución concentrada considerando la cantidad y la pureza del precipitado que se va a obtener. La temperatura de enfriamiento es la misma que anteriormente. En este caso, se puede añadir una semilla de precipitado (una sustancia que actúa como semilla para producir la precipitación; por ejemplo un carotenoide sólido tal como un cristal de carotenoide o similar) para generar el precipitado suavemente.
- 60 El precipitado se recolecta por medio de un dispositivo de filtración de tipo de descompresión o de compresión, una centrífuga o similares. En este proceso, el precipitado recolectado se puede lavar opcionalmente utilizando una pequeña cantidad del mismo disolvente que el disolvente de extracción. Cuando se desea suprimir la oxidación de los carotenoides al nivel mínimo posible, la operación se puede llevar a cabo bajo una atmósfera de gas inerte tal
- 65 como gas nitrógeno. Considerando que el disolvente de lavado se recupera y se reutiliza una pluralidad de veces para el lavado del precipitado que se lleva a cabo para realizar la purificación de alto nivel en una etapa posterior, es

preferible proporcionar algunos medios para recolectar el precipitado bajo tal condición en la que el disolvente utilizado para la extracción permanezca en el precipitado al mínimo nivel posible.

5 También es posible recuperar el disolvente a partir del filtrado que contiene los contaminantes derivados de organismos que se generan cuando se recolecta el precipitado, utilizando un método de destilación o de eliminación por destilación a presión reducida, de forma que el disolvente se pueda reutilizar para la extracción a partir de un microorganismo cultivado, etc. y el lavado del precipitado.

10 Con respecto al proceso de lavado del precipitado resultante para obtener carotenoide altamente puro, la sustancia no secada se puede lavar sin tratamiento adicional, o se lava tras secarse. El precipitado no necesita necesariamente pulverizarse, pero puede pulverizarse antes de lavarse con el fin de mejorar la eficacia del lavado o se puede pulverizar durante el lavado. Para el lavado, es importante utilizar los siguientes disolventes. Las condiciones específicas de lavado se pueden determinar de acuerdo con la pureza del precipitado que se obtiene.

15 El disolvente que se utiliza para el lavado puede ser uno de alcoholes inferiores, alcoholes inferiores que contienen agua, disolventes basados en hidrocarburos, dialquicetonas inferiores, o una combinación de los mismos.

20 De acuerdo con el método de la presente invención, en el caso en que se lleva a cabo la extracción a partir de un cultivo de microorganismo, etc. con un alcohol inferior, un disolvente preferible para utilizarlo en la etapa de lavado es alcohol inferior que contiene agua, o una combinación de un alcohol inferior que contiene agua y un disolvente basado en un hidrocarburo. En el caso en el que se lleva a cabo la extracción a partir de un cultivo de microorganismo, etc. con al menos uno de una dialquicetona inferior y un éter, es preferible lavar el precipitado, que se obtiene concentrando la solución del extracto, con un alcohol inferior (por ejemplo, un disolvente que contiene un alcohol que tiene un número de carbonos de 1 a 3) o una dialquicetona inferior (por ejemplo, un disolvente que
25 contiene una cetona que tiene un número de carbonos de 3 a 6).

30 Los alcoholes inferiores que se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención son metanol, etanol, n-propanol, e isopropanol. El etanol e isopropanol son preferibles, y el etanol es especialmente preferible. Cuando se utiliza un alcohol inferior que contiene agua, el contenido de agua en el alcohol inferior es preferentemente del 5 al 95 %, más preferentemente del 10 al 50 % y especialmente preferentemente del 20 al 40 %.

Las dialquicetonas inferiores que se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención son acetona y metiletilcetona; la acetona es especialmente preferible.

35 En una realización preferible, el lavado se puede llevar a cabo con una mezcla de disolventes que también contiene agua o cualquier otro disolvente orgánico en tal grado que no disminuya la capacidad de lavado.

40 De acuerdo con la presente invención, el precipitado que se obtiene en la etapa de lavado puede lavarse además con un disolvente basado en un hidrocarburo.

Los hidrocarburos que se pueden utilizar incluyen los alquilos que tienen un número de carbonos de 5 a 7 que incluyen un pentano, hexano, ciclohexano, heptano y similares. El hexano y heptano son preferibles, y el hexano es especialmente preferible.

45 De acuerdo con la presente invención, una "combinación de alcohol inferior que contiene agua y un disolvente basado en un hidrocarburo" se refiere a la utilización de un alcohol inferior que contiene agua (por ejemplo, etanol que contiene agua) y un disolvente basado en un hidrocarburo (por ejemplo, hexano), en un estado mezclado, o que se lava con un alcohol inferior que contiene agua (por ejemplo etanol que contiene agua) y entonces se lava con un disolvente basado en un hidrocarburo (por ejemplo, hexano). Desde el punto de vista de la eficacia de lavado el
50 último es preferible.

55 En una realización preferible, el lavado se puede llevar a cabo con una mezcla de disolventes que también contiene agua o cualquier otro disolvente en tal grado que no disminuya la capacidad de lavado. En este caso, sin embargo, es necesario considerar la cantidad de tal disolvente orgánico que permanece en la composición que contiene carotenoide resultante.

60 En cuanto al límite inferior de la cantidad de disolvente que se utiliza para el lavado, es preferible seleccionar una cantidad mínima posible que sea industrialmente aceptable considerando la pureza del precipitado. Por ejemplo, cuando se utiliza etanol que contiene un 25 % de agua, la cantidad es aceptablemente de dos veces o más, preferentemente 4 veces o más, más preferentemente 10 veces o más, y puede ser incluso 20 veces o más cuando sea necesario, con respecto al siguiente peso: cuando se lava un precipitado seco, con respecto al peso del mismo; y cuando se lava un precipitado que no se ha secado, con respecto al peso del estado seco, que se calcula utilizando un coeficiente de conversión que se puede establecer comprobando, antes del secado, la correlación entre el volumen o peso de un precipitado sin secar y el del precipitado secado.
65

El límite superior puede ser 200 veces como máximo. Especialmente desde el punto de vista de la eficacia industrial, el límite superior es preferentemente de 100 veces o menos, más preferentemente 90 veces o menos, aún más preferentemente 40 veces o menos, puede ser 20 veces o menos, si las condiciones se fijan con detalle, y puede ser incluso de 10 veces o menos en algunos casos.

5 Cuando, por ejemplo, se utiliza hexano o acetona para el lavado, la cantidad del mismo será aceptablemente de 40 veces o más cuando sea necesario, con respecto al siguiente peso: cuando se lava un precipitado que se ha secado, con respecto al peso del mismo, y cuando se lava un precipitado que no se ha secado, con respecto al peso del estado seco, que se calcula utilizando un coeficiente de conversión que se puede establecer comprobando, antes del secado, la correlación entre el volumen o el peso del precipitado sin secar y el del precipitado secado. El límite superior puede ser de 200 veces como máximo. Especialmente desde el punto de vista de la eficacia industrial, el límite superior es preferentemente de 100 veces o menos, más preferentemente de 80 veces o menos, aún más preferentemente de 60 veces o menos, y puede ser incluso de aproximadamente 50 veces o menos si las condiciones se fijan con detalle.

15 No hay una limitación específica en el método de lavado. Los métodos preferibles en la práctica incluyen, por ejemplo, un método que lleva a cabo la filtración tras agitar la suspensión, un método que pasa la solución del precipitado anterior, y similares. La temperatura en el momento del lavado es preferentemente de 1 °C a 30 °C en general, pero puede ser de 1 °C o menor o de 30 °C o mayor dependiendo de la situación. El límite superior de la temperatura puede ser alrededor del punto de ebullición del disolvente utilizado para el lavado (por ejemplo, 78 °C para el etanol, 56 °C para la acetona). Cuando se desea suprimir la oxidación de los carotenoides a un nivel mínimo posible, el lavado se puede llevar a cabo bajo una atmósfera de un gas inerte tal como gas nitrógeno.

20 Es posible además recuperar el disolvente a partir del fluido de lavado desechable durante el lavado que se lleva a cabo para obtener carotenoide puro a partir del precipitado, utilizando un método de destilación o de retirada por destilación a presión reducida, de forma que el disolvente que se obtiene se puede reutilizar en otra etapa de lavado.

25 También es preferible añadir opcionalmente una etapa de lavado con agua que sustituye al disolvente, en el final del lavado con el fin de reducir la cantidad del disolvente que permanece en la composición que contiene carotenoide de acuerdo con la presente invención tras el lavado y el secado. Por ejemplo, es preferible añadir una etapa final de lavado con una pequeña cantidad de agua o etanol a baja temperatura.

30 Con el fin de maximizar la cantidad de rendimiento de carotenoide y los componentes principales tales como la astaxantina y similares en la composición que contiene carotenoide que se obtiene por el método descrito anteriormente, las condiciones de las etapas de purificación descritas anteriormente (por ejemplo, el tipo de disolvente de extracción o la solución de lavado) se pueden ajustar adecuadamente.

35 El contenido de carotenoides de la composición que contiene carotenoides de acuerdo con la presente invención es preferentemente del 80 % o más, más preferentemente del 85 % o más, aún más preferentemente del 90 % o más, más preferentemente del 91 % o más, más preferentemente del 95 % o más, especialmente preferentemente del 97 %, y más preferentemente del 98 % o más. El contenido de astaxantina en el carotenoide es preferentemente del 40 % o más, más preferentemente del 45 % o más, aún más preferentemente del 46 % o más, especialmente preferentemente del 47 % o más, más preferentemente del 50 % o más, especialmente preferentemente del 55 % o más, y más preferentemente del 60 % o más.

45 Específicamente, por ejemplo, se obtiene una composición que contiene carotenoide con un contenido del 95 % o más, llevando a cabo la extracción en un cultivo de microorganismo, etc. con acetona, y luego lavando el precipitado, que se obtiene concentrando la solución del extracto, con etanol. Una composición que contiene carotenoide con un contenido del 90 % o más se obtiene llevando a cabo la extracción en un cultivo de microorganismo, etc. con acetona, y luego lavando el precipitado obtenido concentrando la solución del extracto con acetona.

50 Como se ha descrito anteriormente, el método de producción de acuerdo con la presente invención se caracteriza llevando a cabo la extracción a partir de un cultivo de un microorganismo, etc. con al menos uno que se selecciona de entre el grupo que consiste en alcoholes inferiores, dialquícetonas inferiores y éteres, y luego lavando el precipitado, que se obtiene concentrando la solución del extracto, con un alcohol inferior, un disolvente basado en un hidrocarburo o una combinación de los mismos.

55 Los carotenoides se pueden obtener con un alto nivel de pureza solo por medio de estas operaciones tan simples.

60 El método de acuerdo con la presente invención es significativamente ventajoso industrialmente respecto a la técnica convencional en los puntos en los que 1) no necesita una operación complicada y 2) no necesita una operación ineficaz para mejorar la pureza que se lleva a cabo en el estado en el que la concentración de la solución es menor del 1 % o menos, que es necesaria en purificación en columna o extracción líquido-líquido. La presente invención tiene el efecto meritorio de realizar un método industrial superior en los puntos en los que 3) proporciona una composición de carotenoides altamente pura, que contiene astaxantina con un alto contenido y no contiene

ningún disolvente orgánico basado en halógenos, y a bajo coste y 4) es capaz de recuperar fácilmente el disolvente utilizado en cada etapa.

5 Las composiciones que contienen carotenoides se pueden incorporar en alimentos, composiciones farmacéuticas, y sustancias cosméticas.

10 Los fármacos farmacéuticos que comprenden carotenoides altamente puros que contienen astaxantina con alto contenido que se producen de acuerdo con la presente invención están disponibles en polvo, gránulos, píldoras, cápsulas blandas, cápsulas duras, comprimidos, comprimidos masticables, comprimidos que se desintegran, jarabes, medicina en líquido, suspensión, supositorio, ungüento, crema, gel, medicina pegajosa, inhalador, inyección y similares. Estas formulaciones se preparan de acuerdo con el método habitual. Los carotenoides no son altamente solubles en agua, y por lo tanto, se utilizan disueltos en un disolvente orgánico no hidrófilo tal como un aceite vegetal, un aceite animal o similar, o dispersos o en emulsión en una solución acuosa junto con un emulsionante, dispersante, un tensioactivo o similares, utilizando un homogeneizador (homogeneizador a alta presión). Con el fin
15 de mejorar la capacidad del carotenoide para absorberse, el carotenoide se puede utilizar tras haber sido pulverizado con un diámetro medio de partícula de aproximadamente 1 micrómetro.

20 Los aditivos que se pueden utilizar en la producción de las formulaciones incluyen, por ejemplo, aceites vegetales y animales que incluyen aceite de soja, aceite de azafrán, aceite de oliva, aceite de germen, aceite de girasol, sebo bovino, aceite de sardinas y similares; alcoholes polihídricos que incluyen polietilenglicol, propilenglicol, glicerina, sorbitol y similares; tensioactivos que incluyen ésteres de ácidos grasos sorbitán, éster de ácidos grasos sacarosa, éster de ácidos grasos glicerina, éster de ácidos grasos poliglicerina y similares; excipientes que incluyen agua purificada, lactosa, almidón, celulosa cristalina, D-manitol, lecitina, goma arábiga, solución de sorbitol, solución de azúcar y similares; edulcorantes, agentes colorantes, ajustadores de pH, sustancias saborizantes, etc. Una
25 formulación líquida se puede disolver o suspender en agua o en otro medio adecuado cuando se va a administrar. Un comprimido o gránulo se puede revestir por medio de un método bien conocido.

30 La administración por inyección se lleva a cabo preferentemente por vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, percutánea, intra-articular, en la bolsa sinovial, en la bursa, en el periostio, sublingual, oral o similares, y se lleva a cabo especialmente preferentemente por vía intravenosa o intraperitoneal. La administración intravenosa puede ser una administración por goteo o una administración porosa.

35 Cuando se utilizan los carotenoides como un fármaco farmacéutico, la dosis diaria para un adulto es de 1 mg a 3 g, preferentemente de 3 mg a 1 g, y más preferentemente de 10 mg a 670 mg. Cuando se convierte en cantidad por kg de peso corporal, tales dosis son respectivamente, de 17 µg a 50 mg, preferentemente de 54 µg a 17 mg, y 160 µg a 12 mg. Tal dosis se administra una vez al día o se divide en varias veces al día. La cantidad farmacéuticamente eficaz, método de administración, medio de administración y periodo de administración puede establecerla
40 adecuadamente un experto habituado en la técnica de acuerdo con el estado clínico, género, edad, peso corporal o similares de cada objetivo de la administración.

45 Los alimentos que comprenden carotenoides altamente puros que contienen astaxantina en alto contenido de acuerdo con la presente invención están disponibles, por ejemplo, como suplementos (en polvo, gránulos, cápsulas blandas, comprimidos, comprimidos masticables, comprimidos que se disgregan, jarabes, medicinas líquidas, etc.), bebidas (té, bebidas carbonatadas, bebidas lácticas, bebidas de deportistas, etc.), golosinas (gominolas, mermelada, chicle, chocolate, galletas, caramelos, etc.) aceites, grasas y alimentos oleosos (mayonesa, aliños, mantequilla, nata, margarina, etc.), salsas (kétchup, salsa, etc.), alimentos líquidos, productos lácteos (leche, yogur, queso, etc.), panes, fideos (*udon*, *soba*, *ramen*, pasta, fideos fritos, *kishimen*, *somen*, *hiyamugi*, *bihon*, etc.), y similares.

50 Los alimentos funcionales que comprenden carotenoides altamente puros que contienen astaxantina con un alto contenido de acuerdo con la invención pueden contener opcionalmente cualquiera de varios nutrientes, varias vitaminas (vitamina A, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina C, vitamina E, etc.), varios minerales, fibra dietética, ácidos grasos poliinsaturados, otros nutrientes, coenzima Q10, carnitina, sesamina, ácido α-lipoico, inositol, D-quirositol, pinitol, fosfatidilserina, fosfatidil DHA, fosfatidil inositol, taurina, glucosamina, sulfato de condroitina, S-adenosilmetionina, etc.), estabilizantes tales como, por ejemplo, dispersantes y emulsionantes,
55 edulcorantes, componentes potenciadores del sabor (ácido cítrico, ácido málico, etc.), sustancias saborizantes, jalea real, propóleo, agaricus, y similares. También puede contener hierbas tales como el menta, bergamota, camomila, lavanda y similares. También pueden contener elementos tales como teanina, dehidroepiandrosterona, melatonina y similares.

60 Los productos cosméticos que comprenden carotenoides altamente puros que contienen astaxantina con alto contenido de acuerdo con la presente invención incluyen las cremas, loción láctea, loción, esencias en microemulsión, aditivos para el agua de baño y similares, y puede contener esencias aromáticas o similares.

65 Cuando se utilizan carotenoides como alimento o suplemento, no hay una limitación específica en la dosis o manera de administración. La dosis puede ser de 17 µg a 50 mg, preferentemente de 54 µg a 17 mg, y más preferentemente de 160 µg a 12 mg, cuando se convierte la dosis a por 1 kg de peso corporal.

Cuando se utilizan carotenoides como sustancia cosmética, la dosis es de 10 µg a 5 g, preferentemente de 10 µg a 2 g, y más preferentemente de 10 µg a 1 g, por cada 100 g de sustancia cosmética.

Ejemplos

5 La presente invención se describirá por medio de ejemplos, un ejemplo de referencia, ejemplos de formulación y ejemplos de ensayo. El alcance de la presente invención no está limitado por los siguientes ejemplos.

10 En los ejemplos y los ejemplos comparativos, se cuantificaron la astaxantina y carotenoides por cromatografía líquida de altas prestaciones (HPLC). Se conectaron entre ellas dos columnas Wakosil-II 5 SIL-100 (φ 4,6 x 250 mm) (producidas por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) para utilizarlas como una columna. Se llevó a cabo la elución con el flujo de una mezcla en solución de n-hexano-tetrahidrofurano-metanol (40:20:1), que era la fase móvil, con una velocidad de flujo de 1,0 ml/min a una temperatura constante alrededor de la temperatura ambiente. La medición se lleva a cabo de la siguiente manera. La muestra se disolvió en tetrahidrofurano, y la sustancia resultante se disolvió 100 veces en la fase móvil. Se inyectaron 20 µl de la solución resultante. La solución de la columna de elución se detectó a una longitud de onda de 470 nm. Como producto de referencia para la cuantificación, se utilizó la astaxantina producida por Sigma (Nº de cat. A9335). La concentración de astaxantina de la solución de referencia se ajustó utilizando la siguiente expresión después de la medición de la absorbancia de la solución de referencia de 477 nm (A) y el porcentaje del área %(B) del pico de astaxantina en el momento del análisis HPLC bajo las condiciones descritas anteriormente.

$$\text{Concentración de astaxantina (mg/l)} = A \div 2150 \times B \times 100$$

[Ejemplo 1] Producción de carotenoide altamente puro que contiene astaxantina con un alto contenido -- 1

25 Etapa 1: Etapa de cultivo de la cepa E-396

30 Se pusieron 10 ml de un medio que tenía una composición de 2 g/l de glucosa, 3 g/l de extracto de carne, 10 g/l de peptona, y 5 g/l de cloruro sódico, en tubos de ensayo que tenían un diámetro de 18 mm, y que se habían esterilizado por vapor a 121 °C durante 15 minutos. Se inoculó un asa de platino de cepa E-396 (FERM BP-4283) en la sustancia resultante y se sometió a cultivo con agitado de dos maneras a 30 °C durante 6 días a 300 rpm. La solución del cultivo resultante de 200 tubos de ensayo (2 l) se centrifugó y luego se liofilizó para obtener células bacterianas secas que contenían astaxantina con una proporción de 16 mg/g.

35 Etapa 2: Etapa de extracción con etanol

40 Se añadieron 18 kg de etanol a 62 g de las células bacterianas que se obtuvieron en la etapa 1 de este ejemplo, y mientras se agitaba la sustancia resultante a 50 °C durante 3 horas, se extrajo el carotenoide que contenía astaxantina. Luego se retiraron las células bacterianas por filtración, y el aglomerado celular bacteriano se lavó con etanol para obtener 18 kg de solución de extracto que contenía un 0,0028 % (p/p) de astaxantina y tenía una concentración en peso de carotenoide de 0,0050 % (p/p).

Etapa 3: Etapa de concentración de la solución de extracto, y depósito

45 Se concentraron a presión reducida 18 kg de la solución de extracto obtenida en la etapa 2 de este ejemplo utilizando un evaporador para obtener una solución concentrada (aproximadamente 80 g) que contenía un precipitado y también una solución retirada (aproximadamente 17 kg de etanol). La solución concentrada se agitó mientras se enfriaba a una temperatura ambiente de 5 °C durante 1 hora.

50 Etapa 4: Etapa de filtrado del precipitado, y secado

55 Aproximadamente 80 g de la solución concentrada enfriada que se obtuvo en la etapa 3 de este ejemplo se filtró a presión reducida para obtener un aglomerado de precipitado que contenía carotenoides. Se añadieron 20 g de etanol en el aglomerado, y la sustancia resultante se filtró y se lavó, y luego se secó a presión reducida a 35 °C durante una noche para obtener 1,5 g de precipitado seco. Los contenidos de astaxantina y carotenoides en esta sustancia seca eran del 38 % y 64 %, respectivamente.

Etapa 5: Etapa de lavado con etanol que contiene un 25 % de agua y hexano, y secado

60 Se añadieron 100 g de etanol que contiene un 25 % de agua a 1,5 g del precipitado en sustancia seca de la etapa 4 de este ejemplo, y la sustancia resultante se agitó y lavó a temperatura ambiente durante 1 hora en el estado en el que estaba suspendido el carotenoide que corresponde al 0,96 %. La sustancia lavada resultante se muestreó por filtración a presión reducida y se secó a presión reducida a 35 °C durante una noche para obtener 1,02 g de sustancia seca lavada con etanol que contiene un 25 % de agua. Los contenidos de astaxantina y carotenoides en esta sustancia secada lavada con etanol que contiene un 25 % de agua eran del 52 % y el 88 %, respectivamente.

65

Luego, a los 1,02 g de sustancia seca lavada con etanol que contiene un 25 % de agua que se obtuvo, se añadieron 80 g de hexano, y la sustancia resultante se agitó y lavó a temperatura ambiente durante 1 hora en el estado en el que el carotenoide que correspondía al 1,1 % estaba suspendido. La sustancia lavada resultante se muestreó por filtración a presión reducida y se secó a presión reducida a 35 °C durante una noche para obtener 0,88 g de sustancia seca lavada con hexano. Los contenidos de astaxantina y carotenoide en esta sustancia seca lavada con hexano eran del 56 % y el 94 %, respectivamente.

Etapa 6: Etapa de recuperación de los disolventes por destilación a presión reducida

Aproximadamente 100 g (aproximadamente 120 ml) del filtrado generado en la etapa 4 se destiló a presión reducida para recuperar 80 g de etanol en el lado de solución retirada. Aproximadamente 80 g (aproximadamente 118 ml) de hexano filtrado que se generó en la etapa 5 se destiló a presión reducida para recuperar 74 g de hexano en el lado se solución retirada.

[Ejemplo 2] Producción de carotenoide altamente puro que contiene astaxantina con un alto contenido utilizando los disolventes recuperados -- 1

Se añadieron a 31 g de las células bacterianas secas que se obtuvieron en la etapa 1 del Ejemplo 1, 9 kg de la solución retirada (etanol) que se obtuvo en la etapa 3 del Ejemplo 1, y la sustancia resultante se trató por extracción de carotenoides y filtración de las células bacterianas conforme a la etapa 2 del Ejemplo 1 para obtener 9 kg de la solución de extracto. La solución de extracto se concentró a presión reducida conforme a la etapa 3 del Ejemplo 1 para obtener 40 g de solución concentrada enfriada. La solución concentrada enfriada se trató conforme la etapa 4 del Ejemplo 1 para obtener un precipitado por filtración. Luego se añadieron 10 g del etanol recuperado en la etapa 6 del Ejemplo 1 en el aglomerado de precipitado, y se filtró y lavó la sustancia resultante, y luego se secó para obtener 0,75 g de sustancia seca. A esta sustancia seca, se añadieron etanol producido mezclando 37,5 g de etanol recuperado en la etapa 6 del Ejemplo 1 y 12,5 g de agua, y la sustancia resultante se trató conforme a la etapa 5 del ejemplo 1 para obtener 0,51 g de sustancia seca lavada con etanol que contiene un 25 % de agua. A la sustancia seca lavada que se obtuvo con etanol que contiene un 25 % de agua, se añadieron 40 g de hexano recuperado en la etapa 6 del Ejemplo 1, y la sustancia resultante se lavó y secó conforme a la etapa 5 del Ejemplo 1 para obtener 0,44 g de sustancia seca lavada con hexano. Mientras que los contenidos de astaxantina y carotenoide en la sustancia secada con presión reducida pero antes de que se lavaran con etanol que contiene un 25 % de agua y hexano eran respectivamente del 38 % y el 64 %, los contenidos de astaxantina y carotenoide en la sustancia seca lavada con etanol que contiene un 25 % de agua y hexano eran respectivamente del 56 % y 94 %.

A partir de lo anterior, se confirmó que la reutilización de los disolventes recuperados no presentaba problemas.

[Ejemplo 3] Producción de carotenoide altamente puro que contiene astaxantina con un alto contenido -- 2

Las etapas de cultivo bacteriano, extracción, y concentración y almacenamiento se llevaron a cabo como en las etapas 1 a 3 del Ejemplo 1, y aproximadamente 80 g de la solución concentrada enfriada que se obtuvo en la etapa 3 se filtró a presión reducida conforme a la etapa 4 del Ejemplo 1 para obtener un aglomerado precipitado que contiene carotenoides. Se añadieron 20 g de etanol al aglomerado, y la sustancia resultante se filtró y se lavó. Luego, una parte del aglomerado se muestreó con el fin de comprobar el contenido de carotenoides en el precipitado. La etapa de secado se omitió. Entonces, se añadieron 100 g de etanol que contiene un 25 % de agua en el aglomerado, y la sustancia resultante se volvió a filtrar y lavar. El aglomerado obtenido por filtración y lavado se secó a presión reducida a 35 °C durante una noche para obtener 1,5 de sustancia seca lavada con etanol que contiene un 25 % de agua. Mientras que los contenidos de astaxantina y carotenoides en la sustancia secada a presión reducida antes de lavarse con etanol que contiene un 25 % de agua eran respectivamente un 38 % y 64 %, los contenidos de astaxantina y carotenoides en la sustancia seca lavada con etanol que contiene un 25 % de agua eran respectivamente del 52 % y el 88 %.

A partir de aproximadamente 100 g (aproximadamente 120 ml) del filtrado obtenido por filtración del precipitado que se lleva a cabo conforme la etapa 4 del Ejemplo 1, se recuperaron 85 g de etanol.

[Ejemplo 4] Producción de carotenoides altamente puros que contienen astaxantina con un alto contenido que utiliza el disolvente recuperado -- 2

Se añadieron a 31 g de las células bacterianas secas utilizadas en el Ejemplo 3, 9 kg de la solución retirada obtenida en el Ejemplo 3, y la sustancia resultante se trató por extracción de carotenoides y filtración de las células bacterianas conforme a la etapa 2 del Ejemplo 1 para obtener 9 kg de solución de extracto. La solución de extracto se concentró a presión reducida conforme la etapa 3 del Ejemplo 1 para obtener aproximadamente 40 g de solución concentrada enfriada. La solución concentrada enfriada se trató conforme la etapa 4 del Ejemplo 1 para obtener un precipitado por filtración. La etapa de secado se omitió como en el Ejemplo 3. Luego, se añadieron 50 g de etanol que contiene un 25 % de agua producido por la mezcla de 37,5 g del etanol recuperado en el Ejemplo 3 y 12,5 g de agua en el aglomerado de precipitado, y la sustancia resultante se filtró y se lavó. El aglomerado obtenido por filtración y lavado se secó a presión reducida a 35 °C durante una noche para obtener 0,58 g de sustancia seca

lavada con etanol que contiene un 25 % de agua. Mientras que los contenidos de astaxantina y carotenoide en la sustancia secada a presión reducida pero antes de lavarse con etanol que contiene un 25 % de agua eran respectivamente del 38 % y el 64 %, los contenidos de astaxantina y carotenoides en la sustancia seca lavada con etanol que contiene un 25 % de agua eran respectivamente del 52 % y el 88 %.

5 A partir de lo anterior, se confirmó que incluso cuando se utiliza el etanol recuperado por destilación a presión reducida en el Ejemplo 4, se reconoció que no había reducción de la capacidad de lavado.

[Ejemplo de alimento 1] Margarina

10 La composición de astaxantina que se obtiene en el Ejemplo 1 se añadió como antioxidante y agente colorante a un aceite vegetal tal que la composición de astaxantina estaría contenida en un 5 % por peso de margarina. La sustancia resultante se agitó junto con un emulsionante y similares para que estuviera uniforme, y se produjo la margarina por el método habitual. En comparación con la margarina normal, la margarina obtenida mostraba un color rojizo pálido debido a la presencia de astaxantina.

[Ejemplo de alimento 2] Huevas de salmón artificiales

20 Se añadió la composición de astaxantina que se obtiene en el Ejemplo 1 a una solución acuosa del 1 % de alginato sódico con una proporción del 0,6 %, y se dispersaron con un homogeneizador. La sustancia resultante se dejó caer en una solución acuosa con el 5 % de cloruro cálcico como coagulante y se moldearon en esferas que tenían un diámetro de 5 mm, las esferas tenían una apariencia externa próxima a la natural, y eran muy similares a las huevas de salmón en términos de forma, color y sabor.

25 [Ejemplo de formulación 1] Comprimido que contiene astaxantina

30 Con 120 partes por peso de una composición que contenía carotenoides que se obtuvo en el Ejemplo 1, se mezclaron 330 partes por peso de celulosa cristalina, 15 partes por peso de carmelosa-calcio, 10 partes por peso de hidroxipropilcelulosa y 60 partes por peso de agua purificada con un método habitual, y la sustancia resultante se secó. Luego se añadieron 10 partes por peso de estearato magnésico a la misma, y la sustancia resultante se comprimió para obtener 100 mg de comprimidos que contenían una composición que contiene carotenoides en una proporción de 20 mg/pieza.

[Ejemplo de formulación 2] Cápsula blanda que contiene astaxantina

35 Una parte por peso de la composición que contiene astaxantina que se obtuvo en el Ejemplo 1 se suspendió en aceite de soja con una parte por peso 5 veces mayor, y la sustancia resultante se mezcló suficientemente para que estuviera uniforme. Luego, la sustancia resultante se cargó en cápsulas utilizando un cargador de cápsulas para obtener unas cápsulas marrón rojizo que contenían cada una 300 mg.

[Ejemplo de cosmético] Crema que contiene astaxantina (sustancia cosmética)

40 La composición que contiene astaxantina que se obtuvo en el Ejemplo 1, se añadió a vaselina blanca de forma que contenía una proporción del 10 % por peso, y la sustancia resultante se agitó en conjunto con un agente aromático y similares de forma que estaba uniforme. Luego, se produjo la crema por un método habitual.

[Ejemplo 5] Producción de carotenoides altamente puros que contienen astaxantina con un alto contenido -- 3

Etapa 1: Etapa de cultivo de la cepa E-396

50 Se pusieron 10 ml de un medio que tiene una composición de 2 g/l de glucosa, 3 g/l de extracto de carne, 10 g/l de peptona, y 5 g/l de cloruro sódico, en tubos de ensayo que tenían un diámetro de 18 mm, y que se habían esterilizados por vapor a 121 °C durante 15 minutos. Se inoculó un asa de platino de cepa E-396 (FERM BP-4283) en la sustancia resultante y se sometió a cultivo con agitado de dos maneras a 30 °C durante 6 días a 300 rpm. La solución del cultivo resultante de 200 tubos de ensayo (2 l) se centrifugó y luego se liofilizó para obtener células bacterianas secas que contenían astaxantina con una proporción de 16 mg/g.

Etapa 2: Etapa de extracción con acetona

60 A 50 g de las células bacterianas secas que se obtuvieron en la etapa 1 de este ejemplo, se añadieron 2,2 kg de acetona, y mientras se agitaba la sustancia resultante a 50 °C durante 1 hora, se extrajo el carotenoide que contiene astaxantina. Luego, se retiraron las células bacterianas por filtración, y el aglomerado de células bacterianas se lavaron con acetona para obtener 2,3 kg de solución de extracto que contenía un 0,0034 % (p/p) de astaxantina y que tenía una concentración en peso de carotenoides del 0,077 % (p/p).

65

Etapa 3: Etapa de concentración de la solución de extracto, y depósito

2,3 kg de la solución de extracto que se obtuvo en la etapa 2 de este ejemplo se concentraron a presión reducida utilizando un evaporador para obtener una solución concentrada (aproximadamente 80 g) que contenía un precipitado y también una solución retirada (aproximadamente 2 kg de acetona). La solución concentrada se agitó mientras se enfriaba a una temperatura ambiente de 5 °C durante 1 hora.

Etapa 4: Etapa de filtración del precipitado, y secado

Aproximadamente 80 g de la solución concentrada enfriada que se obtuvo en la etapa 3 de este ejemplo se filtraron a presión reducida para obtener un aglomerado de precipitado que contenía carotenoides. Se añadieron 20 g de acetona en el aglomerado, y la sustancia resultante se filtró y lavó, y luego se secó a presión reducida a 35 °C durante una noche para obtener 2,13 g de precipitado seco. Los contenidos de astaxantina y carotenoides en esta sustancia seca eran del 34 % y 71 %, respectivamente.

Etapa 5: Etapa de lavado con etanol, y secado

A 2,13 g de precipitado seco que se obtuvo en la etapa 4 de este ejemplo, se añadieron 80 g de etanol, y el precipitado resultante se agitó y lavó a temperatura ambiente durante 1 hora en el estado en el que el carotenoide que correspondía al 1,8 % estaba suspendido. La sustancia lavada resultante se muestreó por filtración a presión reducida y se secó a presión reducida a 35 °C durante una noche para obtener 1,49 g de sustancia seca lavada con etanol. Los contenidos de astaxantina y carotenoides en esta sustancia seca lavada con etanol eran del 47 % y 98 %, respectivamente.

Etapa 6: Etapa de recuperación de los disolventes por destilación a presión reducida

Aproximadamente 100 g (aproximadamente 120 ml) del filtrado generado en la etapa 4 se destiló a presión reducida para recuperar 80 g de acetona el lado de solución retirada. Aproximadamente 80 g (aproximadamente 100 ml) del filtrado generado en la etapa 5 se destiló a presión reducida para recuperar 76 g de etanol en el lado de solución retirada.

[Ejemplo 6] Producción de carotenoides altamente puros que contienen astaxantina con un alto contenido utilizando disolvente recuperado -- 3

A 25 g de células bacterianas secas que se obtuvieron en la etapa 1 del Ejemplo 5, se añadieron 1,1 kg de solución retirada (acetona) que se obtuvo en la etapa 3 del Ejemplo 5, y la sustancia resultante se trató por extracción de carotenoides y filtración de las células bacterianas conforme a la etapa 2 del Ejemplo 5 para obtener 1,2 kg de solución de extracto. La solución de extracto se concentró a presión reducida conforme a la etapa 3 del Ejemplo 5 para obtener aproximadamente 40 g de solución concentrada enfriada. La solución concentrada enfriada se trató conforme a la etapa 4 del Ejemplo 5 para obtener un precipitado por filtración. Luego, se añadieron 10 g de acetona recuperada en la etapa 6 del Ejemplo 5, y la sustancia resultante se lavó y se secó conforme a la etapa 5 del Ejemplo 5 para obtener 0,72 g de sustancia seca lavada con etanol. Mientras que los contenidos de astaxantina y carotenoides en la sustancia secada a presión reducida pero antes de lavarse con etanol eran respectivamente del 33 % y 70 %, los contenidos de astaxantina y carotenoides en la sustancia seca lavada con etanol eran respectivamente del 46 % y el 97 %.

A partir de lo anterior, se confirmó que la reutilización de disolventes recuperados no presentaba ningún problema.

[Ejemplo 7] Producción de carotenoides altamente puros que contienen astaxantina con un alto contenido -- 4

Las etapas de cultivo bacteriano, extracción y concentración y depósito se llevaron a cabo como las etapas 1 a 3 del Ejemplo 5, y aproximadamente 80 g de la solución concentrada enfriada que se obtiene en la etapa 3 se filtraron a presión reducida conforme a la etapa 4 del Ejemplo 5 para obtener un aglomerado precipitado que contenía carotenoides. Se añadieron 20 g de acetona en el aglomerado, y la sustancia resultante se filtró y lavó. Luego, una parte del aglomerado se muestreó con el fin de comprobar el contenido de carotenoides en el precipitado. La etapa de secado se omitió. Luego se añadieron 80 g de etanol en el aglomerado, y la sustancia resultante se volvió a filtrar y lavar. El aglomerado que se obtuvo por filtración y lavado se secó a presión reducida a 35 °C durante una noche para obtener 1,50 g de sustancia seca lavada con etanol. Mientras que los contenidos de astaxantina y carotenoides en la sustancia secada a presión reducida pero antes de lavarse con etanol eran respectivamente de 33 % y 70 %, los contenidos de astaxantina y carotenoides en la sustancia seca lavada con etanol eran respectivamente del 46 % y 97 %.

De los aproximadamente 100 g (aproximadamente 120 ml) del filtrado que se obtuvieron por filtración del precipitado que se llevó a cabo conforme a la etapa 4 del Ejemplo 5, se recuperaron 85 g de acetona. De los aproximadamente 80 g (aproximadamente 100 ml) del filtrado que se obtuvo en la etapa de lavado con etanol que se llevó a cabo conforme a la etapa 5 del Ejemplo 5, se recuperaron 75 g de etanol contaminado con una cantidad traza de acetona.

[Ejemplo 8] Producción de carotenoides altamente puros que contienen astaxantina con un alto contenido utilizando disolventes recuperados -- 4

5 A 25 g de las células bacterianas secas que se utilizaron en el Ejemplo 7, se añadieron 1,1 kg de la solución retirada (acetona) que se obtuvo en el Ejemplo 7, y la sustancia resultante se trató por extracción de carotenoides y filtración de las células bacterianas conforme con la etapa 2 del Ejemplo 5 para obtener 1,1 kg de solución de extracto. La solución de extracto se concentró a presión reducida conforme a la etapa 3 del Ejemplo 5 para obtener aproximadamente 40 g de solución concentrada enfriada. La solución concentrada enfriada se trató conforme a la etapa 4 del Ejemplo 5 para obtener un precipitado por filtración. Luego, se añadieron 10 g de la acetona que se obtuvo en el Ejemplo 7 en el aglomerado precipitado, y la sustancia resultante se filtró y lavó. La etapa de secado se omitió como en el Ejemplo 7. Se añadieron 40 g de etanol recuperado en el Ejemplo 7 a la misma, y la sustancia resultante se volvió a filtrar y lavar. El aglomerado obtenido por la filtración y lavado se secó a presión reducida a 35 °C durante una noche para obtener 0,73 g de sustancia seca lavada con etanol. Mientras que los contenidos de astaxantina y carotenoide en la sustancia secada a presión reducida pero antes de lavarse con etanol eran respectivamente de 34 % y 71 %, los contenidos de astaxantina y carotenoides en la sustancia seca lavada con etanol eran respectivamente del 46 % y 97 %.

20 En el Ejemplo 8, se confirmó que incluso cuando se utiliza el etanol contaminado con acetona recuperado por destilación a presión reducida, no se reconoce una reducción en la capacidad del lavado. Sin embargo, considerando que el etanol se recupera y se reutiliza una pluralidad de veces, se considera preferible proporcionar algunos medios para filtrar el precipitado bajo tal condición para que la acetona permanezca en el precipitado a un nivel mínimo posible, antes de la etapa de lavado con etanol.

[Ejemplo 9] Producción de carotenoides altamente puros que contienen astaxantina con un alto contenido -- 5

25 El procedimiento se llevó de la misma manera que en el Ejemplo 5 excepto que en el lavado se llevó a cabo con acetona en vez de con etanol. Los contenidos de astaxantina y carotenoides en la sustancia seca que se obtenían eran respectivamente del 45 % y el 91 %.

30 [Ejemplo de referencia 1] Medición de la concentración de astaxantina disuelta a temperatura ambiente

La concentración de astaxantina (producida por Sigma) que se disuelve a temperatura ambiente se midió y se muestra en la Tabla 1.

35

Tabla 1

Tipo	Disolvente	Concentración % (p/p)
Hidrocarburos	Hexano	0,003
	Ciclohexano	0,001
	Tolueno	0,03
	Benceno	0,05
Alcoholes	Metanol	0,003
	Etanol	0,002
	Isopropanol	0,002
Cetonas	Acetona	0,02
	Metiletilcetona	0,03
	Metilisobutilcetona	0,02
	Ciclohexanona	0,2
Éteres	1,4-dioxano	0,3
	Tetrahidrofurano	0,7
Halógenos	Diclorometano	2,3
	Cloroformo	0,7

40 Como está claro en la Tabla 1, se descubrió que la concentración disuelta en disolventes distintos de disolventes halógenos que tiene carcinogenicidad o mutagenicidad era del 1 % o menos. A partir de lo presente, se reveló que siempre que se utilice un disolvente orgánico general que tenga un nivel relativamente bajo de peligrosidad en una distribución líquido-líquido de la técnica convencional, es muy difícil realizar una purificación de alto nivel utilizando una solución que tenga una concentración de carotenoides que exceda el 1 %. Esto es un grave problema para la producción industrial.

El método de la presente invención utiliza la solidificación/lavado de sólidos, en vez de distribución líquido-líquido. Cuando se utiliza un disolvente que se puede utilizar con seguridad que disuelve una concentración de un 1 % o menos, los métodos convencionales necesitan utilizar una gran cantidad de solución diluida para la solución de separación y por lo tanto se necesitan grandes instalaciones y esto es ineficaz. Por el contrario, el método de la presente invención se lleva a cabo en una escala pequeña.

[Ejemplo comparativo 1] Método de producción conforme al Ejemplo 1-1 de la Publicación de Patente Japonesa abierta a inspección pública N° H 8-253695

A 2,3 kg (2,9 l) de solución de extracto que se obtuvo sustancialmente de la misma manera que en las etapas 1 a 2 del Ejemplo 5, que tenía una concentración de astaxantina de 0,034 % (p/p) y una concentración de carotenoides de 0,077 % (p/p), se añadieron 1,9 kg (2,9 l) de hexano y 2,9 kg (2,9 l) de solución salina al 1 %, y la sustancia resultante se agitó durante 1 hora. Tras dejarlo en reposo, la sustancia resultante se separó en dos capas para obtener 3,7 l (2,5 kg) de una capa superior de hexano y 5 l (4,6 kg) de una capa inferior de agua. La capa de hexano que se obtuvo se concentró a presión reducida por un evaporador para preparar aproximadamente 0,3 l de solución concentrada. Después se dejó la solución concentrada en reposo a 4 °C durante 12 horas, se filtró la sustancia resultante y se lavó, y luego se secó a presión reducida durante una noche para obtener 1,45 g de sustancia seca que tenía un contenido de astaxantina del 47 % y un contenido de carotenoides del 98 %.

Con respecto a las condiciones de purificación de carotenoides, por ejemplo, en el Ejemplo 5, era suficiente aproximadamente un 1,8 % (p/p) de suspensión de carotenoide; mientras que en el Ejemplo comparativo 1, era necesario poner en contacto 5 l de capa de agua con 3,7 l de solución de hexano que tenía una concentración de carotenoide de aproximadamente 0,07 % (p/p). A partir de lo presente, se descubrió que la presente invención es más eficaz industrialmente que el método del Ejemplo comparativo 1.

También con respecto a la cantidad total de las soluciones, el volumen total de acetona y etanol que se utilizan, por ejemplo, en el Ejemplo 5 era de 2,925 l, mientras que el volumen total de acetona, hexano y solución salina al 1 % que se utilizaba en el Ejemplo comparativo 1 era de 8,725 l. La cantidad de las soluciones que se utilizaron en las etapas del Ejemplo comparativo 1 era aproximadamente 3 veces mayor. Por lo tanto, se descubrió que el método de la presente invención es más eficaz industrialmente.

De los aproximadamente 2,9 l de acetona que se utilizaron para la extracción, se recuperaron aproximadamente 2,8 l, por ejemplo, en los Ejemplos 5 y 7 como solución retirada a la vez que se concentraba la solución de extracto a presión reducida durante la producción. Por el contrario en el Ejemplo comparativo 1 se necesitaba una operación de recuperación de acetona y hexano que se lleva a cabo por fraccionamiento de nuevo de aproximadamente 3,4 l de la solución retirada de acetona y hexano que se obtuvieron por concentración de la capa de hexano a presión reducida, y también una operación de recuperación de acetona de nuevo de aproximadamente 5 l de capa de agua. A partir de lo presente, se descubrió que el método de la presente invención puede recuperar más fácilmente el disolvente.

[Ejemplo de alimento 3] Margarina

La composición de astaxantina que se obtuvo en el Ejemplo 5 se añadió como un antioxidante y agente colorante a un aceite vegetal tal que la composición de astaxantina estuviera contenida en un 5 % por peso de margarina. La sustancia resultante se agitó en conjunto con un emulsificador y similar de forma que estuviera uniforme, y se produjo la margarina por un método habitual. En comparación con la margarina habitual, la margarina que se obtuvo mostraba un color rojo pálido debido a la presencia de astaxantina.

[Ejemplo de alimento 4] Huevas de salmón artificiales

La composición de astaxantina que se obtuvo en el Ejemplo 5 se añadió a una solución acuosa con un 1 % de alginato sódico con una proporción del 0,6 %, y se dispersó con un homogeneizador. La sustancia resultante se dejó caer en una solución acuosa al 5 % de cloruro cálcico como coagulante y se moldeó en esferas que tenían un diámetro de 5 mm. Las esferas tenían una apariencia externa próxima a la natural, y eran muy similares a las huevas de salmón en términos de forma, color y sabor.

[Ejemplo de formulación 3] Comprimido que contiene astaxantina

A 120 partes por peso de una composición que contenía carotenoides que se obtuvo en el Ejemplo 5, se mezclaron 330 partes por peso de celulosa cristalina, 15 partes por peso de carmelosa-calcio, 10 partes por peso de hidroxipropilcelulosa y 60 partes por peso de agua purificada con un método habitual, y la sustancia resultante se secó. Luego se añadieron 10 partes por peso de estearato magnésico a la misma, y la sustancia resultante se comprimó para obtener 100 mg de comprimidos que contenían una composición que contiene carotenoides en una proporción de 20 mg/pieza.

[Ejemplo de formulación 4] Cápsula blanda que contiene astaxantina

5 Una parte por peso de la composición que contiene astaxantina que se obtuvo en el Ejemplo 5 se suspendió en aceite de soja con una parte por peso 5 veces mayor, y la sustancia resultante se mezcló suficientemente para que estuviera uniforme. Luego, la sustancia resultante se cargó en cápsulas utilizando un cargador de cápsulas para obtener unas cápsulas marrón rojizo que contenían cada una 300 mg.

[Ejemplo de cosmético] Crema que contiene astaxantina (sustancia cosmética)

10 La composición que contiene astaxantina que se obtuvo en el Ejemplo 5, se añadió a vaselina blanca de forma que contenía una proporción del 10 % por peso, y la sustancia resultante se agitó en conjunto con un agente aromático y similares de forma que estaba uniforme. Luego, se produjo la crema por un método habitual.

15 **Aplicabilidad industrial**

La presente invención puede proporcionar una composición que contiene un alto contenido de carotenoides de origen natural, altamente puros, de bajo coste y seguros, y un método para producir industrialmente los mismos. Por lo tanto, la presente invención puede proporcionar también un alimento funcional, una composición farmacéutica y una sustancia cosmética que comprende tal composición.

20 Texto libre del listado de secuencias

SEC ID N° 1

Información de desconocido: E-396

25 n es a, c, g o t (posición: 1350)

LISTADO DE SECUENCIAS

30 <110> Nippon Oil Corporation Asahi Kasei Pharma Corporation

<120> Proceso para la producción de carotenoides

<130> G08-0055

35 <140> PCT/JP2007/057518

<141> 28-03-2007

<150> JP2006-087223

<151> 28-03-2006

40 <150> JP2006-149794

<151> 30-05-2006

<160> 1

45 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 1452

50 <212> ADN

<213> Desconocido

<220>

<223> E-396

55 <220>

<221> misc_feature

<222> (1350)..(1350)

<223> n es a, c, g o t

60 <400> 1

ES 2 548 520 T3

agtttgatcc tggtcagaa cgaacgctgg cggcaggctt aacacatgca agtcgagcga 60
 gaccttcggg tctagcggcg gacgggtgag taacgcgtgg gaacgtgccc ttctctacgg 120
 aatagccccg ggaaactggg agtaataccg tatacgcctt ttgggggaaa gatttatcgg 180
 agaaggatcg gcccgcttg gattaggtag ttggtgggt aatggccac caagccgacg 240
 atccatagct ggtttgagag gatgatcagc cacactggga ctgagacacg gccagactc 300
 ctacgggagg cagcagtggg gaatcttaga caatgggggc aacctgac tagccatgcc 360
 gogtgagtga tgaaggcctt agggttgtaa agctcttca gctgggaaga taatgacggt 420
 accagcagaa gaagccccgg ctaactccgt gccagcagcc gcgtaatac ggagggggct 480
 agcgttgctt ggaattactg ggcgtaaagc gcacgtagcc ggactggaaa gtcagagggt 540
 aatcccagg gctcaacctt ggaactgect ttgaaactat cagtctggag ttcgagagag 600
 gtgagtggaa ttccgagtgt agaggtgaaa ttcgtagata ttcggaggaa caccagtggc 660
 gaagcggct cactggctcg atactgacgc tgaggtgcga aagcgtgggg agcaaacagg 720
 attagatacc ctggtagtcc acgccgtaa cgatgaatgc cagacgtcgg caagcatgct 780
 tgcggtgct acacctaacg gattaagcat tccgcctggg gactacggtc gcaagattaa 840
 aactcaaagg aattgacggg ggcccgcaca agcggaggag catgtggttt aattogaagc 900
 aacgcgcaga acctacca ccttgacat ggcaggaccg ctggagagat tcagctttct 960
 cgtaagagac ctgcacacag gtgctgatg gctgtctca gctcgtctc tgagatgttc 1020
 ggtaagtcc ggcaacgagc gcaaccacg tccctagttg ccagcaattc agttgggaac 1080

ES 2 548 520 T3

tctatgaaa ctgccgatga taagtcggag gaaggtgtgg atgacgtcaa gtcctcatgg 1140
gccttacggg ttgggetaca caogtgctac aatggtggtg acagtgggtt aatccccaaa 1200
agccatctca gttcggattg tcctctgcaa ctcgaggcca tgaagttgga atcctagta 1260
atcgcggaac agcatgcegc ggtgaatagc ttccogggcc ttgtacacac cgcccgtcac 1320
accatgggag ttggttctac ccgacgacgn tgcgctaacc ttcggggggc aggogggccac 1380
gtaggatca gcgactgggg tgaagtcgta acaaggtagc cgtaggggaa cctgoggctg 1440
gatcacctcc tt 1452

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una composición que contiene carotenoides, que comprende las siguientes etapas 1) a 3):
- 5
- 1) llevar a cabo la extracción en un cultivo de un microorganismo, un concentrado del cultivo o una sustancia seca del mismo con al menos uno que se selecciona de entre el grupo que consiste en metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, acetona, metiletilcetona y tetrahidrofurano;
 - 2) concentrar la solución de extracto que se obtiene para obtener un precipitado; y
 - 10 3) lavar el precipitado con al menos uno que se selecciona de entre el grupo que consiste en metanol, metanol que contiene agua, etanol, etanol que contiene agua, n-propanol, n-propanol que contiene agua, isopropanol, isopropanol que contiene agua, acetona y metiletilcetona.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende las siguientes etapas 1) a 3):
- 15
- 1) llevar a cabo la extracción con etanol o acetona en un cultivo de un microorganismo, un concentrado del cultivo o una sustancia seca del mismo;
 - 2) concentrar la solución de extracto obtenida para obtener un precipitado; y
 - 20 3) lavar el precipitado con etanol, etanol que contiene agua o acetona.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende las siguientes etapas 1) a 3):
- 1) llevar a cabo la extracción con etanol en un cultivo de un microorganismo, un concentrado del cultivo o una sustancia seca del mismo;
 - 25 2) concentrar la solución de extracto obtenida para obtener un precipitado; y
 - 3) lavar el precipitado con etanol que contiene agua.
4. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende las siguientes etapas 1) a 3):
- 30
- 1) llevar a cabo la extracción con acetona en un cultivo de un microorganismo, un concentrado del cultivo o una sustancia seca del mismo;
 - 2) concentrar la solución de extracto obtenida para obtener un precipitado; y
 - 3) lavar el precipitado con etanol.
- 35 5. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende las siguientes etapas 1) a 3):
- 1) llevar a cabo la extracción con acetona en un cultivo de un microorganismo, un concentrado del cultivo o una sustancia seca del mismo;
 - 2) concentrar la solución de extracto obtenida para obtener un precipitado; y
 - 40 3) lavar el precipitado con acetona.
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además la siguiente etapa:
- 45
- 4) lavar adicionalmente con hexano el precipitado que se obtiene en la etapa 3).
7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la composición que contiene carotenoide contiene un 80 % o más de carotenoide.
- 50 8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el carotenoide contiene un 40 % o más de astaxantina.
9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que una secuencia de bases de ADN del microorganismo correspondiente al ARN 16S ribosómico es sustancialmente homóloga a la secuencia de bases representada por la SEC ID N° 1.
- 55
10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el microorganismo es la cepa E-396 (FERM BP-4283) o un mutante de la misma.
- 60 11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la composición que contiene carotenoides se incorpora en un alimento, una composición farmacéutica o una sustancia cosmética.