

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 630 704**

51 Int. Cl.:

C12P 23/00 (2006.01)

C07C 403/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.05.2011 PCT/IN2011/000343**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **24.11.2011 WO11145113**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.05.2011 E 11740723 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017 EP 2571996**

54 Título: **Procedimiento para la producción de cristales de beta-caroteno y licopeno de alta pureza de biomasa fúngica**

30 Prioridad:

17.05.2010 IN CH13802010

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

23.08.2017

73 Titular/es:

**DYNADIS BIOTECH (INDIA) PRIVATE LIMITED
(100.0%)
23, II Floor, Vallalar Salai, Raja Rajeswari Nagar
Puducherry 605 011, IN**

72 Inventor/es:

**JOSEPH, SURESH y
ANANDANE, ARNAUD**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 630 704 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

Procedimiento para la producción de cristales de beta-caroteno y licopeno de alta pureza de biomasa fúngica

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un campo de compuestos carotenoides producidos microbianamente y se refiere particularmente al método de extracción de compuestos carotenoides tales como beta-caroteno y licopeno de alta pureza de biomasa fúngica y a un procedimiento optimizado de aislar compuestos carotenoides de alta pureza.

Antecedentes de la invención

10 Los carotenoides son la clase más extendida de pigmentos naturales en la naturaleza, presentes sin excepción en el tejido fotosintético y que aparecen sin patrón definido en tejidos no fotosintéticos tales como raíces, pétalos de flores, semillas y frutos. También se encuentran en algas, hongos, levaduras, mohos, setas y bacterias. Representan el grupo más extendido de pigmentos naturales que existe en la naturaleza. Se usan en la industria como suplementos alimentarios y colorantes. Son conocidos por sus excelentes propiedades antioxidantes y como precursores de la vitamina A.

15 El beta-caroteno y el licopeno son importantes carotenoides usados ampliamente en la industria nutricional, farmacéutica, alimentaria y de alimentos para animales como antioxidantes naturales, color funcional y para la fortificación de alimentos y piensos. Los cristales carotenoides de alta pureza desempeñan un papel importante en las diversas formulaciones como encapsulación, polvo o emulsión soluble en agua, dispersión de aceite de alta concentración, etc.

20 Estos cristales de carotenoide de alta pureza no sólo facilitan la más fácil formulación del producto, sino que también ayudan a suministrar productos finales altamente concentrados para satisfacer las crecientes demandas del mercado de antioxidantes y colorantes naturales. Se han propuesto y ensayado varios métodos para aislar y purificar Carotenoides y específicamente beta-caroteno.

25 Los carotenoides y el beta-caroteno, en particular se pueden obtener a partir de fuentes naturales, ya sean productos vegetales como el tomate y la zanahoria en los que están en porcentajes muy pequeños o a partir de cultivos de algas, hongos, etc. seleccionados, en los que se puede incrementar la proporción de estos componentes.

30 El beta-caroteno obtenido a partir de caldos de fermentación de ciertos hongos mucor tales como *Phycomyces*; *Blakeslea* etc. tiene ciertas ventajas sobre las fuentes naturales mencionadas anteriormente, por ejemplo, 1. Elevada concentración de este compuesto con respecto a la cantidad de biomasa seca, 2. Posible incremento de la producción usando 'cepas mejoradas que producen carotenoide' obtenidas por técnicas clásicas de mutagénesis/biología molecular; optimización de procesos de fermentación, uso de "inductores/inhibidores'.

Por ejemplo: la Patente de EE.UU. No. 2.959.521 describe una producción mejorada de beta-caroteno a partir de hongos *Blakeslea trispora* en un medio de cultivo que contiene Lecitina.

35 La patente de EE.UU. No. 7.799.540 describe un procedimiento de producción de licopeno por medio de la fermentación de cepas seleccionadas de *Blakeslea trispora* y extrayendo licopeno mediante un procedimiento de tratamiento del cultivo fermentado con alcohol y de secado de la biomasa seguido de un procedimiento mecánico de molienda para romper la pared celular y la biomasa rota se extrae mediante un disolvente orgánico y los cristales se recuperan mediante cristalización por precipitación por adición de alcohol. La principal desventaja de este procedimiento es el método de molienda mecánica para la disrupción celular que puede provocar la pérdida de licopeno;

40 La patente de EE.UU. No. 7.252.965 describe un método de producción de beta-caroteno por fermentación de cepas (+) y (-) de *Blakeslea trispora* seguido de separación de la biomasa húmeda y tratamiento con alcohol para secar la biomasa para la ruptura celular, a continuación la biomasa de células rotas se somete a extracción sólido-líquido con un disolvente orgánico y se concentra. Precipitación/cristalización mediante la adición de alcohol, de este modo se obtienen cristales puros de pureza > 95%. (Un procedimiento similar también se explica en la solicitud de patente de EE.UU. No. 20040067550), la desventaja de este procedimiento es la disrupción mecánica y el secado de la biomasa que podría provocar la pérdida de beta-caroteno y la complejidad del uso de múltiples disolventes para las etapas de extracción y precipitación.

50 Patente de EE.UU. No. 7.015.014 (equivalente al documento WO 01/55100) enseña un método para el aislamiento de cristales de carotenoide por disrupción de células microbianas para obtener un medio aceitoso; esta suspensión aceitosa se trata con agua y el pH se ajusta añadiendo álcali y se trata adicionalmente con alcohol o sal para obtener un filtrado que contiene cristales de beta-caroteno. Este filtrado se somete a varias etapas de lavado con múltiples disolventes seguido de una etapa de separación y secado para obtener cristales purificados. Este procedimiento implica el uso de un mayor número de disolventes y medios acuosos para la purificación

La solicitud de patente internacional WO 03/038064 A2 describe un método para producir licopeno por fermentación

- de *Blakeslea trispora* mutada. Los cristales de licopeno se extraen del caldo de cultivo mediante etapas de purificación subsecuentes de disrupción celular usando disolventes orgánicos tales como acetato de etilo, hexano y 1-butanol ajustando el PH usando un álcali con adición opcional de alcohol o ácido para ajustar el pH; esto se purifica adicionalmente con disolvente orgánico y se lava con un disolvente de nueva aportación para dar cristales de licopeno. Este proceso es altamente complejo, se usan cantidades mayores de disolventes y reactivos para las etapas de purificación.
- 5
- La patente de EE.UU. No. 6.812.001 (equitante de los documentos EP 0979302 y WO 01/83437 A1) describe un método para obtener cristales de carotenoide a partir de biomasa microbiana, el método implica disrupción de la pared celular por homogeneización y seguido de retirada de lípido mediante tratamiento con alcohol. Los cristales de los desechos celulares son recogidos por flotación en agua. Según este método, se puede usar sal de éter o aceite en lugar de agua para hacer flotar los cristales, el rendimiento obtenido de este modo es solo del 35%.
- 10
- El documento WO 98/50574 enseña un método para aislar cristales de carotenoide de biomasa microbiana que implica romper las paredes celulares microbianas, retirando los restos celulares del residuo que contiene cristal de carotenoide resultante. Se añadió más disolvente para retirar el lípido. A continuación, los carotenoides se extraen usando acetato de etilo, hexano o aceite seguido de varias etapas de purificación y lavado que requieren más disolvente y agua en el procedimiento, de este modo se consigue la pureza de los cristales del 93,3% con un rendimiento solo del 35%.
- 15
- La patente de EE.UU. No. 5.858.700 enseña un procedimiento para la purificación de cristales de licopeno saponificando licopeno que contiene oleorresina usando propilenglicol, álcali y agua para recuperar los cristales
- 20
- La patente de EE.UU. No. 5.714.658 describe un procedimiento para la extracción de carotenos de fuentes naturales usando una mezcla de un éster de ácido acético (acetato de etilo o acetato de butilo o en combinación) y con un aceite comestible.
- La patente de EE.UU. No. 3268606 describe un procedimiento de extracción de beta-caroteno de biomasa fúngica tratando el micelio fermentado con alcohol para retirar la humedad y extrayendo el micelio seco con cloruro de etileno o benceno en varias etapas para producir un filtrado rico en beta-caroteno. Este filtrado se concentra adicionalmente y se somete a cristalización con acetona y alcohol absoluto para recuperar los cristales de beta-caroteno de alta pureza. La desventaja de este procedimiento es la complejidad en la aplicación industrial, el uso de disolventes tóxicos como el benceno.
- 25
- La solicitud de patente de EE.UU. No. 20020025548 (equivalente al documento WO/1998/003480) describe un método para extraer el beta-caroteno de fuentes naturales mediante extracción directa con disolventes orgánicos, aceites vegetales o fluidos supercríticos, seguido de cristalización o precipitación y lavado de los cristales con un anti-disolvente.
- 30
- La solicitud de patente de EE.UU. No. 20060105443 explica un procedimiento para aislar licopeno de células bacterianas transformadas o derivadas naturalmente; las etapas en el procedimiento comprenden: aislar una biomasa de un caldo fermentado; tratar la biomasa aislada con alcohol; extraer el licopeno de la biomasa tratada con alcohol con cloruro de metileno; la mezcla sólida se retira y el filtrado se contrae a vacío; la suspensión concentrada se lava con acetona para recuperar los cristales de licopeno.
- 35
- La solicitud de patente de EE.UU. No. 20060234333 (equivalente al documento WO/2004/063359) describe un método para producir carotenoides o sus precursores utilizando organismos genéticamente modificados del género *blakeslea*. El procedimiento implica la recuperación de biomasa del medio y el lavado de la misma con agua. La biomasa se esteriliza y las roturas celulares se llevan a cabo usando vapor o radiación de microondas seguido de extracción usando disolventes tales como diclorometano o dióxido de carbono supercrítico o tetrahidrofurano. El filtrado obtenido después de la extracción se somete a una etapa de cristalización usando un disolvente en el que no es soluble el carotenoide.
- 40
- El documento CN101870668 describe un método para preparar beta-caroteno a partir de *Blakeslea trispora* mediante fermentación y secado de la biomasa y molienda y pulverización de micelios secos, seguido de extracción con disolvente usando diclorometano. La principal desventaja de este procedimiento es la disrupción mecánica de las células usando molienda y pulverización que conducirá a la pérdida de beta-caroteno.
- 45
- La solicitud de patente de EE.UU. No. 20100145116 (equivalente al documento WO/2008/108674) describe un procedimiento para la producción y extracción de carotenoides sin disrupción celular por extracción directa sólido-líquido usando una cetona y alcohol (acetona y etanol o acetona y metanol) seguido de una segunda extracción usando una mezcla de disolventes hidrófobos (hexano y ((terc-butil)-metil-éter) y finalmente cristalización. La principal desventaja del procedimiento es usar más número de disolventes, múltiples etapas de extracción y un procedimiento complicado.
- 50
- Es claramente evidente que los procedimientos descritos de la técnica anterior implican: tipos diferentes y gran cantidad de disolventes orgánicos para la extracción de cristales substancialmente puros de beta-caroteno o
- 55

licopeno y los métodos son complicados. En la mayoría de los casos la pureza del producto final está por debajo de las expectativas. Los procedimientos para obtener beta-caroteno a partir de caldos de fermentación descritos hasta ahora implican generalmente una etapa de extracción y sucesivas cristalizaciones y recristalizaciones e incluso etapas de purificaciones cromatográficas que requieren un alto consumo de disolventes. Por consiguiente, existe una necesidad de un método simple, rentable e industrialmente viable para la extracción.

Objetivos y sumario de la invención

Un objetivo de la invención es proporcionar un método simple y rentable para extraer carotenoides tales como beta-caroteno y licopeno a partir de biomasa fúngica

Otro objetivo de la invención es proporcionar un procedimiento sencillo de extracción con un solo disolvente para recuperar cristales de carotenoides substancialmente puros, en el que la pureza es casi del 99% sin usar un procedimiento adicional de purificación con agua o adición de cualquier otro disolvente.

Otro objetivo más de esta invención es proporcionar un procedimiento con valor añadido, es decir, un procedimiento que produce subproductos importantes y comercialmente útiles.

El objetivo de la invención es un método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

La presente invención describe un procedimiento para la producción de cristales de beta-caroteno y licopeno con una pureza de un mínimo de 99% a partir de fuentes naturales, especialmente de biomasa fúngica producida por la fermentación de *Blakeslea trispora* para dar biomasa lista que contiene carotenoides tales como beta-caroteno y licopeno. El procedimiento comprende las siguientes etapas.

a) El pretratamiento de la biomasa con alcohol acidificado con ácido acético para retirar aceites libres, azúcares y otras impurezas solubles en la biomasa y también para incrementar la porosidad celular para una mejor extracción de carotenoides.

b) La extracción en dos etapas de la biomasa tratada con un solo disolvente tal como acetato de etilo. La extracción inicial es con una relación de disolvente de 20 veces y la segunda extracción con una relación de disolvente de 10 veces.

c) La concentración adicional de dicho extracto hasta el 60% del volumen en condiciones de vacío.

d) La cristalización de beta-caroteno o licopeno a partir de dicho extracto concentrado por enfriamiento a baja temperatura.

e) La recuperación del cristal se realiza por filtración a vacío.

f) La evaporación al vacío del filtrado de la etapa anterior para recuperar el disolvente del residuo.

Las concentraciones del extracto madre producen una oleorresina rica en carotenoide que contiene beta-caroteno o licopeno, respectivamente.

El rendimiento global del procedimiento es $\geq 87\%$.

En una realización preferida, el método proporciona cristales de beta-caroteno o licopeno a partir de una fuente natural con una pureza $\geq 99\%$ y subproducto de oleorresina de baja pureza, que se trata adicionalmente con la biomasa usada y el residuo de la etapa de pretratamiento, para dar una mezcla de alimentos para animales

Descripción detallada de la invención

La presente invención describe un procedimiento para la producción de carotenoide cristalino con una pureza de por lo menos el 99%, lo más preferentemente el 99,9% mediante un procedimiento de extracción industrial de un solo disolvente, simple, eficiente y altamente rentable y económicamente viable. La eficiencia de extracción y la pureza de los cristales se mejoran mediante un procedimiento de pretratamiento con etanol acidificado con homogeneización a baja temperatura.

El etanol acidificado con ácido acético se prepara por tratamiento con ácido acético de dicho alcohol con una relación menor de 4,5% (peso/peso), preferentemente menor de 3,5% (peso/peso), más preferentemente menor de 2,5% (peso/peso), lo más preferentemente menor de 2,2% (peso/peso)

El procedimiento de la invención comprende las siguientes etapas:

La biomasa que contiene carotenoides preferentemente de hongos *Blakeslea trispora* se somete a tratamiento previo y disrupción celular por tratamiento con alcohol suavemente acidificado, mientras que el ácido es ácido acético suave y el alcohol es etanol, con homogeneización para retirar los compuestos anti-pureza tales como aceites libres, proteínas, minerales, carbohidratos, y para incrementar la porosidad celular hasta un punto de

incrementar la eficiencia del procedimiento de extracción.

A continuación, la biomasa pretratada se somete a separación mecánica para recuperar la biomasa sólida para su procesado adicional. El filtrado se recoge y se almacena para procesado adicional.

5 La siguiente etapa implica una extracción sólido-líquido usando un disolvente orgánico, preferentemente acetato de etilo con una relación de 15-40 veces, preferentemente 15-30 veces, más preferentemente 18-25 veces, y lo más preferentemente 19-22 veces. La extracción se llevó a cabo a una temperatura de alrededor de 40°C a 80°C, más preferentemente de 45°C a 75°C y lo más preferentemente de 48°C a 60°C.

10 La mezcla extraída se filtra mecánicamente para separar el licor madre que contiene los cristales de carotenoide y la biomasa usada. La biomasa usada se somete adicionalmente a una extracción secundaria (extracción repetida) con el mismo disolvente orgánico, acetato de etilo con una relación de 5-20 veces, preferentemente 7-18 veces, más preferentemente 8-15 veces, y lo más preferentemente 8,5-12,5 veces. Cuando la extracción se llevó a cabo a una temperatura de alrededor de 40°C a 80°C, más preferentemente de 45°C a 75°C y lo más preferentemente de 48°C a 60°C.

15 La segunda mezcla extraída se filtra mecánicamente para recuperar el licor madre y la biomasa usada, de este modo el licor madre recogido de las dos etapas de extracción se junta para obtener una mezcla homogénea de una suspensión que contiene los carotenoides extraídos.

Esto es seguido de un método de cristalización por enfriamiento para recuperar los cristales, la temperatura de enfriamiento es de -5°C a 10°C, preferentemente de -3°C a 8°C, más preferentemente de -2,5°C a 6,5°C, y lo más preferentemente -1°C a 5°C.

20 La suspensión enfriada se filtra usando un filtro mecánico de alta eficiencia a vacío para obtener cristales de beta-caroteno o licopeno de alta pureza.

Finalmente, los cristales recuperados se sometieron a secado al vacío para retirar las trazas de disolvente restante de los cristales húmedos, dando como resultado cristales de beta-caroteno o de licopeno de alta pureza libres de disolvente.

25 El licor madre usado con trazas de carotenoide se concentra adicionalmente para producir oleorresina con 1-5% de beta-caroteno o licopeno, preferentemente 1,5-4,5%, más preferentemente de 1,6 a 4,0% y lo más preferentemente de 1,7 a 3,9%

30 La oleorresina, la biomasa usada y el residuo del pretratamiento de la primera etapa se mezclan junto con ingredientes como carga, aglomerantes y se extruyen adicionalmente para producir pelets de valor añadido para la aplicación en alimentos para animales y otras aplicaciones. Se usan cargas como celulosa, dextrina, gomas, etc. y se usa aglomerante tal como el basado en celulosa, basado en almidón, etc.

Ejemplo 1:

35 Se cargan 50 g de biomasa de *Blakeslea trispora* que contiene 62,20 g/kg de beta-caroteno en un matraz de fondo redondo de 0,5 litros de capacidad con un agitador. A esto se añaden 150 ml de etanol acidificado con ácido acético al 2% en etanol a temperatura ambiente de 35°C, a continuación esta mezcla se agita durante 30 min. Una vez completado el tratamiento, la mezcla tratada se filtra a vacío para producir 53,4 g de biomasa. A continuación, la biomasa tratada se transfiere a un matraz de fondo redondo de 5 litros de capacidad, al que se añaden 1.000 ml de acetato de etilo. Esta mezcla se homogeneiza durante una hora con agitación a una temperatura de alrededor de 50°C en un sistema de baño de agua caliente. Después de una hora, la mezcla se filtra a vacío para dar 47,3 g de biomasa extraída y 980 ml de licor madre. El licor madre se mantiene almacenado para la recuperación adicional de beta-caroteno. A continuación se toma la biomasa extraída para la segunda extracción con 500 ml de acetato de etilo en las mismas condiciones como la primera extracción. Después de la segunda extracción, se recuperaron 426 ml de licor madre y 47,2 g de biomasa usada. La biomasa usada se trata adicionalmente y se usa para aplicaciones de piensos. El licor madre tanto de la primera como de la segunda extracción se agrupa en un matraz de fondo 40 redondo de 2.000 ml y se concentra hasta el 60% del volumen y a continuación se enfría a 5°C en un baño de agua fría durante un tiempo de una hora para la cristalización de beta-caroteno. Después del enfriamiento, el licor madre se filtra a vacío para recuperar los cristales y a continuación se seca a vacío, obteniendo 2,16 g de cristales de beta-caroteno con una pureza espectrofotométrica del 99,30%. El licor madre filtrado se destila completamente a vacío para recuperar 15,23 g de oleorresina de beta-caroteno con una pureza espectrofotométrica de 1,16%. En este 45 procedimiento el rendimiento total es de alrededor de 89,96%.

Ejemplo 2:

55 Se cargan 50 g de biomasa de *Blakeslea trispora* que contiene 62,20 g/kg de beta-caroteno en un matraz de fondo redondo de 0,5 litros de capacidad con un agitador. A esto se añaden 150 ml de etanol acidificado con ácido acético al 2% en etanol a temperatura ambiente de 35°C, a continuación esta mezcla se agita durante 30 min. Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se filtra a vacío para dar 51,2 g de biomasa tratada. A continuación la

biomasa tratada se transfiere a continuación a un matraz de fondo redondo de 5 litros de capacidad, al que se añaden 1.000 ml de acetato de etilo. Esta mezcla se homogeneiza durante una hora con agitación a una temperatura de alrededor de 50°C en un sistema de baño de agua caliente. Después de una hora, la mezcla se filtra a vacío para dar 49,1 g de biomasa extraída y 988 ml de licor madre. El licor madre se almacena para la recuperación adicional de beta-caroteno. A continuación se toma la biomasa extraída para la segunda extracción con 500 ml de acetato de etilo en las mismas condiciones como la primera extracción. Después de la segunda extracción, se recuperaron 442 ml de licor madre y 49,1 g de biomasa usada. La biomasa usada se trata adicionalmente y se usa para aplicaciones de piensos. El licor madre tanto de la primera como de la segunda extracción se agrupa en un matraz de fondo redondo de 2.000 ml, sin concentración la mezcla se enfría a 5°C en baño de agua fría durante un tiempo de una hora para la cristalización de beta-caroteno. Después de enfriar, el licor madre se filtra a vacío para recuperar los cristales y a continuación se seca a vacío, obteniendo 2,53 g de cristales de beta-caroteno con una pureza espectrofotométrica del 99,01%. El licor madre filtrado se destila completamente a vacío para recuperar 10,23 g de oleorresina de beta-caroteno con una pureza espectrofotométrica del 2,16%. En este procedimiento el rendimiento total es de alrededor de 79,68%.

15 **Ejemplo 3:**

Se cargan 500 g de biomasa de *Blakeslea trispora* que contiene 62,20 g/kg de beta-caroteno en un matraz de fondo redondo de 5,0 litros de capacidad con un agitador. A esto se añaden 1.500 ml de etanol acidificado con ácido acético al 2% en etanol a temperatura ambiente de 35°C, a continuación esta mezcla se agita durante 30 min. Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se filtra a vacío para dar 518,0 g de biomasa tratada. A continuación, la biomasa tratada se carga a continuación en un matraz de fondo redondo de 15 litros de capacidad, al que se añaden 10.000 ml de acetato de etilo. Esta mezcla se homogeneiza durante una hora con agitación a una temperatura de alrededor de 50°C en un sistema de baño de agua caliente. Después de una hora, la mezcla se filtra a vacío para dar 494,0 g de biomasa extraída y 9.100 ml de licor madre. El licor madre se almacena para la recuperación adicional de beta-caroteno. A continuación se toma la biomasa extraída para la segunda extracción con 5.000 ml de acetato de etilo en las mismas condiciones como la primera extracción. Después de la segunda extracción, se recuperaron 4.400 ml de licor madre y 494 g de biomasa usada. La biomasa usada se trata adicionalmente y se usa para aplicaciones de piensos. El licor madre tanto de la primera como de la segunda extracción se agrupó en un matraz de fondo redondo de 20 litros y se concentró hasta el 60% del volumen y a continuación se enfrió a 5°C en un baño de agua fría durante un tiempo de una hora para la cristalización de beta-caroteno. Después del enfriamiento, el licor madre se filtra a vacío para recuperar los cristales y a continuación se seca a vacío, obteniendo 25,731 g de cristales de beta-caroteno con una pureza espectrofotométrica de 99,07%. El licor madre filtrado se destila completamente a vacío para recuperar 173,24 g de oleorresina de beta-caroteno con una pureza espectrofotométrica de 1,46%. En este procedimiento, el rendimiento total es de alrededor de 90,10%.

35 **Ejemplo 4:**

Se cargan 5 kg de biomasa de *Blakeslea trispora* que contiene 62,20 g/kg de beta-caroteno en una planta piloto de 150 litros de capacidad con un agitador, a esto se añaden 15 litros de etanol acidificado con ácido acético al 2% en etanol a temperatura ambiente de 35°C, a continuación esta mezcla se agita durante 30 min. Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se centrifuga para dar 5,24 kg de biomasa tratada. A continuación, la biomasa tratada se carga a continuación en una planta piloto de 150 litros de capacidad, a la que se añaden 100 litros de acetato de etilo. Esta mezcla se homogeneiza durante una hora con agitación a una temperatura de alrededor de 50°C en un sistema de baño de agua caliente. Después de una hora, la mezcla se filtra a vacío para dar 4,84 kg de biomasa extraída y 91 litros de licor madre. El licor madre se almacena para la recuperación adicional de beta-caroteno. A continuación se toma la biomasa extraída para la segunda extracción con 50 litros de acetato de etilo en las mismas condiciones como la primera extracción. Después de la segunda extracción, se recuperaron 42 litros de licor madre y 5,12 kg de biomasa usada. La biomasa usada se trata adicionalmente y se usa para aplicaciones de piensos. El licor madre tanto de la primera como de la segunda extracción se agrupó en un matraz de fondo redondo de 200 litros y se concentró hasta el 60% del volumen y a continuación se enfrió a 5°C en baño de agua fría durante un tiempo de una hora para la cristalización de beta-caroteno. Después del enfriamiento, el licor madre se filtra a vacío para recuperar los cristales y a continuación se seca a vacío, obteniendo 245,8 g de cristales de beta-caroteno con una pureza espectrofotométrica del 99,34%. El licor madre filtrado se destila completamente a vacío para recuperar 1.473,32 g de oleorresina de beta-caroteno con una pureza espectrofotométrica del 2,09%. En este procedimiento, el rendimiento total es de alrededor de 88,41%.

50 **Ejemplo 5:**

Se cargan 500 g de biomasa de *Blakeslea trispora* que contiene 37,20 g/kg de licopeno en un matraz de fondo redondo de 5,0 litros de capacidad con un agitador. A esto se añaden 1.500 ml de etanol acidificado con ácido acético al 2% en etanol a temperatura ambiente de 35°C, a continuación esta mezcla se agita durante 30 min. Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se filtra a vacío para dar 481,0 g de biomasa tratada. A continuación, la biomasa tratada se carga a continuación en un matraz de fondo redondo de 15 litros de capacidad, al que se añaden 10.000 ml de acetato de etilo. Esta mezcla se homogeneiza durante una hora con agitación a una temperatura de aproximadamente 50°C en un sistema de baño de agua caliente. Después de una hora, la mezcla se

filtra a vacío para dar 442,0 g de biomasa extraída y 9.100 ml de licor madre. El licor madre se almacena para la recuperación adicional de beta-caroteno. A continuación se toma la biomasa extraída para la segunda extracción con 5.000 ml de acetato de etilo en las mismas condiciones como la primera extracción. Después de la segunda extracción, se recuperaron 4.600 ml de licor madre y 464 g de biomasa usada. La biomasa usada se trata adicionalmente y se usa para aplicaciones de piensos. El licor madre tanto de la primera como de la segunda extracción se agrupó en un matraz de fondo redondo de 20 litros y se concentró hasta el 60% del volumen y después se enfrió a 5°C en un baño de agua fría durante un tiempo de una hora para la cristalización de licopeno. Después del enfriamiento, el licor madre se filtra a vacío para recuperar cristales y a continuación se seca a vacío, obteniendo 15,55 g de cristales de licopeno con una pureza espectrofotométrica de 99,85%. El licor madre filtrado se destila completamente a vacío para recuperar 30,5 g de oleorresina de beta-caroteno con una pureza espectrofotométrica de 2,90%. En este procedimiento, el rendimiento total es de alrededor de 88,23%.

La presente invención describe una producción de carotenoide cristalino con muy alta pureza; pureza de casi 99% o más, lo más preferentemente 99,9% mediante un procedimiento de extracción con un solo disolvente, simple, eficiente y económico. La eficiencia de extracción y la pureza de los cristales se mejoran mediante un proceso de pretratamiento con etanol acidificado de ácido acético con homogeneización a baja temperatura.

El etanol acidificado significa una cantidad de ácido acético u otros ácidos en el disolvente menor de 4,5% (peso/peso), preferentemente menor de 3,5% (peso/peso), más preferentemente menor de 2,5% (peso/peso), lo más preferentemente menor de 2,2% (peso/peso).

Procedimiento de la invención:

Ejemplo: (a) Desintegración de biomasa que contiene carotenoide, preferentemente de Fungi spp. que incluye *Blakeslea* por tratamiento con alcohol suavemente acidificado, mientras que el ácido es ácido acético suave y el alcohol es etanol, con homogeneización para retirar los compuestos anti-pureza tales como aceites libres, proteínas, minerales, carbohidratos, etc. hasta el punto de incrementar la eficiencia del procedimiento.

(b) Separación mecánica de la biomasa tratada para recuperar la biomasa sólida para procesado adicional.

(c) La biomasa tratada se extrae a continuación con un disolvente orgánico, preferentemente acetato de etilo con una relación de 15-40 veces, preferentemente 15-30 veces, más preferentemente 18-25 veces, y lo más preferentemente 19-22 veces.

(d) La mezcla extraída se filtra mecánicamente para recuperar el licor madre y la biomasa usada.

(e) La biomasa usada se extrae por segunda vez con el mismo disolvente orgánico, acetato de etilo con una relación de 5-20 veces, preferentemente 7-18 veces, más preferentemente 8-15 veces y lo más preferentemente 8,5-12,5 veces.

(f) La segunda mezcla extraída se filtra mecánicamente para recuperar el licor madre y la biomasa usada

(g) Los cristales de alta pureza se recuperan del licor madre reunido tanto de ambas extracciones en condiciones de enfriamiento, la temperatura de enfriamiento es de -5°C a 10°C, preferentemente de -3°C a 8°C, más preferentemente de -2,5°C a 6,5°C, y lo más preferentemente de -1°C a 5°C.

(h) Los cristales de carotenoide de alta pureza se recuperan por el separador mecánico.

(i) Las trazas de disolvente se retiran del cristal aislado mediante secado a vacío para dar cristales de alta pureza libres de disolvente.

(j) El licor madre usado con trazas de carotenoide se concentra adicionalmente para producir oleorresina con 1-5% de carotenoide, preferentemente 1,5-4,5%, más preferentemente de 1,6 a 4,0% y lo más preferentemente de 1,7 a 3,9%

(k) La oleorresina, la biomasa usada y el residuo del pretratamiento se mezclan junto con ingredientes como carga, aglomerantes y se extruyen adicionalmente para producir pelets de valor añadido para aplicaciones de alimentos para animales y otras aplicaciones. Se usan cargas tales como celulosa, dextrina, gomas, etc. y se usa aglomerante tal como el basado en celulosa, basado en almidón, etc.

REIVINDICACIONES

1. Un método de extracción de carotenoides de alta pureza de biomasa fúngica, comprendiendo dicho método las etapas de:
 - 5 a) tratamiento de biomasa que contiene carotenoides con alcohol acidificado con ácido acético, en el que el alcohol acidificado comprende menos de 4,5% (peso/peso) de ácido acético, para incrementar la porosidad celular.
 - b) separar mecánicamente la biomasa tratada de la etapa a) para obtener biomasa sólida y almacenar el filtrado para procesado adicional.
 - 10 c) extraer de la biomasa tratada (el beta-caroteno o licopeno) con un disolvente orgánico.
 - d) filtrar la mezcla extraída de la etapa anterior para recuperar licor madre que contiene cristales de carotenoides y la biomasa usada.
 - e) repetir la extracción de la biomasa usada de nuevo con el mismo disolvente.
 - 15 f) filtrar la segunda mezcla extraída obtenida de la etapa anterior para recuperar licor madre y la biomasa usada.
 - g) recuperar los cristales puros del licor madre mezclado obtenido de la etapa d) y la etapa f) en condiciones de enfriamiento por el método de cristalización por enfriamiento.
 - h) filtrar la suspensión enfriada usando filtro mecánico de alta eficiencia a vacío y secar a vacío para conseguir cristales de beca caroteno y licopeno de alta pureza.
 - 20 j) concentrar adicionalmente el licor madre gastado de la etapa g) con trazas de carotenoide para producir oleoresina con 1-5% de beta-caroteno y licopeno, preferentemente 1,5-4,5%, más preferentemente de 1,6 a 4,0% y lo más preferentemente de 1,7 a 3,9%.
2. El método de extracción según la reivindicación 1, en el que la biomasa fúngica usada es *Blakeslea Sp.*
3. El método de extracción según la reivindicación 2, en el que la biomasa fúngica usada es *Blakeslea trispora*.
 4. El método de extracción según la reivindicación 1, en el que el alcohol acidificado con ácido acético se prepara tratando ácido acético con alcohol con una relación menor de 4,5% (peso/peso), preferentemente menor de 3,5% (peso/peso), más preferentemente menor de 2,5% (peso/peso), lo más preferentemente menor de 2,2% (peso/peso).
5. El método de extracción según la reivindicación 4, en el que el alcohol acidificado consiste en etanol y ácido acético.
6. El método de extracción según la reivindicación 1, en el que el disolvente orgánico usado en la etapa c) para la extracción es acetato de etilo.
7. El método de extracción según la reivindicación 6, en el que se usa acetato de etilo con una relación de 15-40 veces, preferentemente 15-30 veces, más preferentemente 18-25 veces, y lo más preferentemente 19-22 veces.
8. El método de extracción según la reivindicación 1, en el que el disolvente orgánico usado en la etapa e) para la extracción es acetato de etilo con una relación de 5-20 veces, preferentemente 7-18 veces, más preferentemente 8-15 veces, y lo más preferentemente 8,5-12,5 veces.
9. El método de extracción según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el procedimiento de extracción de la biomasa tratada se lleva a cabo a una temperatura de alrededor de 40°C a 80°C, más preferentemente de 45°C a 75°C y lo más preferentemente de 48° a 60°C.
10. El método de extracción según la reivindicación 8, en el que el procedimiento de extracción se lleva a cabo a una temperatura de alrededor de 40°C a 80°C, más preferentemente de 45°C a 75°C y lo más preferentemente de 48°C a 60°C.
11. El método de extracción según la reivindicación 1, en el que la cristalización por enfriamiento de la etapa g) se lleva a cabo a una temperatura de -5°C a 10°C, preferentemente de -3°C a 8°C, más preferentemente de -2,5°C a 6,5°C, y lo más preferentemente de -1°C a 5°C.

12. Un método para extracción de carotenoides de alta pureza de biomasa fúngica, comprendiendo dicho método la etapa de pretratar la biomasa con etanol acidificado con ácido acético, en el que el alcohol acidificado con ácido acético comprende menos de 4,5% (peso/peso) de ácido acético, para incrementar la porosidad celular, y la extracción sólido-líquido usando acetato de etilo.

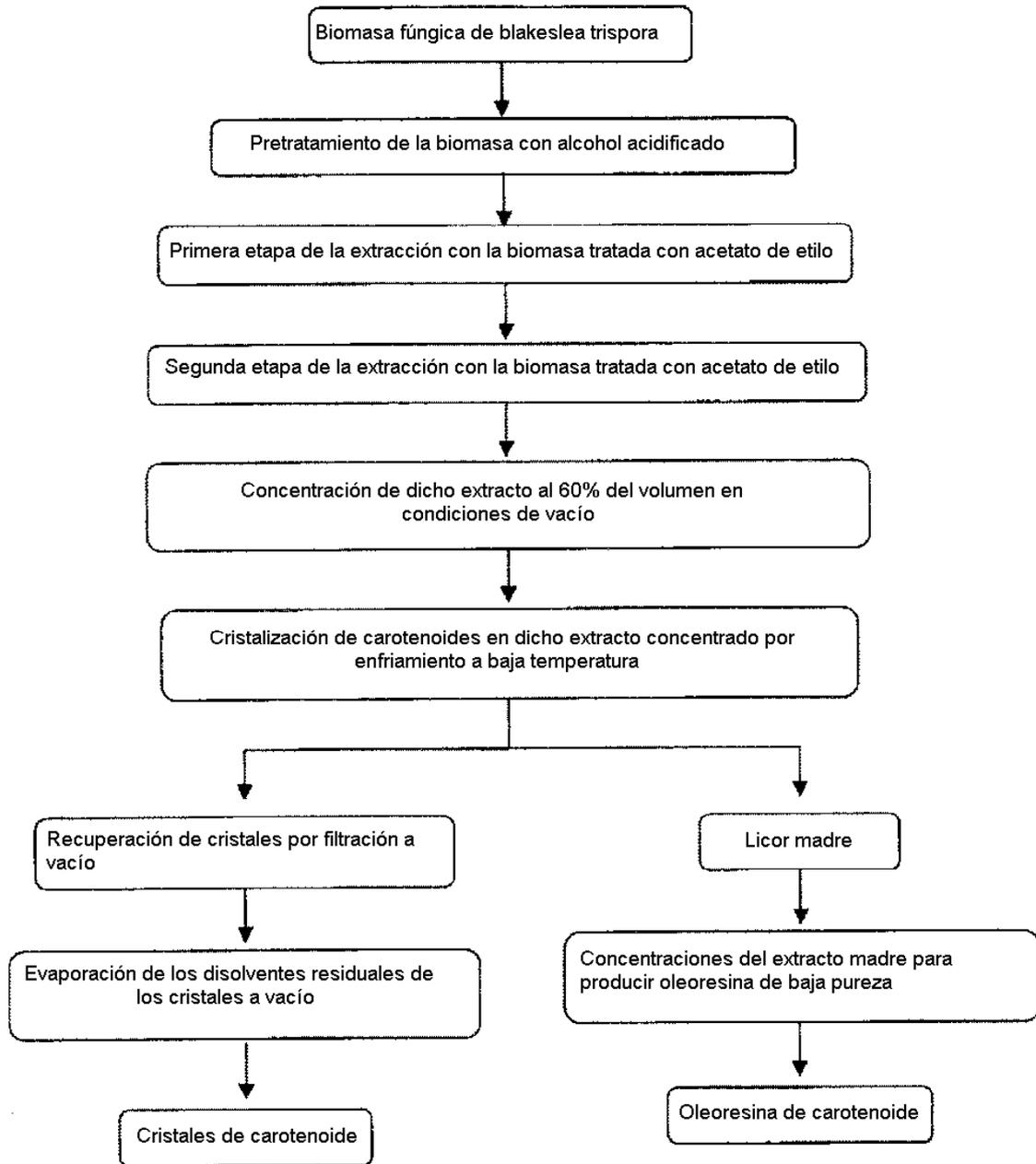


FIGURA - 1