

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 680 471**

51 Int. Cl.:

C07C 403/24 (2006.01)

C12P 23/00 (2006.01)

C11B 1/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.03.2015** **PCT/EP2015/056594**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.10.2015** **WO15144831**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2015** **E 15712899 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.05.2018** **EP 3122723**

54 Título: **Procedimiento para aislar un carotenoide a partir de un bioorganismo productor de carotenoides**

30 Prioridad:

28.03.2014 EP 14162365

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

07.09.2018

73 Titular/es:

DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)
Het Overloon 1
6411 TE Heerlen, NL

72 Inventor/es:

TREGANOWAN, JAMES;
SANTOS, CARLOS;
KESSLER, JULIA;
GRENFELL-LEE, DANIEL;
TONIATO, CLAUDIA y
SCHAEFER, CHRISTIAN

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 680 471 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 aislar un carotenoide a partir de un bioorganismo productor de carotenoides

La presente invención se refiere a un procedimiento mejorado para aislar un carotenoide a partir de un bioorganismo productor de carotenoides y también se describe en la presente memoria una formulación que comprende dicho carotenoide y el uso de dicha formulación sólida en productos de pienso (o premezclas).

Los carotenoides son pigmentos orgánicos que varían en color de amarillo a rojo, que son producidos de manera natural por ciertos bioorganismos, incluyendo organismos fotosintéticos (por ejemplo, plantas, algas, cianobacterias) y algunos hongos. Los carotenoides son responsables del color naranja de las zanahorias, así como el rosa en los flamencos y el salmón y el rojo en langostas y camarones. Los animales, sin embargo, no pueden producir carotenoides y deben obtenerlos por la dieta.

Los pigmentos carotenoides (por ejemplo, β -caroteno y astaxantina) se usan industrialmente como ingredientes para alimentos y materias primas, satisfaciendo ambos una función nutricional y mejorando la aceptabilidad del consumidor. Por ejemplo, la astaxantina se usa extensamente en acuicultura del salmón para proporcionar la pigmentación rosa/roja característica de sus homólogos salvajes. Algunos carotenoides proporcionan potenciales beneficios para la salud, por ejemplo, como precursores de vitamina A o antioxidantes (véase, por ejemplo, Jyonouchi et al., Nutr. Cancer 16:93, 1991; Giovannucci et al., J. Natl. Cancer Inst. 87:1767, 1995; Miki, Pure Appl. Chem 63:141, 1991; Chew et al., Anticancer Res. 19:1849, 1999; Wang et al., Antimicrob. Agents Chemother. 44:2452, 2000). Algunos carotenoides tales como astaxantina, β -caroteno, licopeno, luteína y zeaxantina se venden actualmente como suplementos nutricionales.

Los carotenoides naturales pueden obtenerse por extracción de material vegetal o por síntesis microbiana, pero, solo se usan extensamente algunas plantas para la producción comercial de carotenoides y la productividad de la síntesis de carotenoides en estas plantas es relativamente baja. La producción microbiana de carotenoides es una ruta de producción más atractiva. Ejemplos de microorganismos productores de carotenoides (=bioorganismos) incluyen: algas (*Haematococcus pluvialis*, vendida con el nombre NatuRose(TM) por Cyanotech Corp., Kailua-Kona, HI.; *Dunaliella* sp.; *Thraustochytrium* sp.), levadura (*Phaffia rhodozyma*, recientemente renombrada como *Xanthophyllomyces dendrorhous*; *Labyrinthula* sp.; *Saccharomyces cerevisiae* y *Yarrowia lipolytica*) y bacterias (*Paracoccus marcusii*, *Bradyrhizobium*, *Rhodobacter* sp., *Brevibacterium*, *Escherichia coli* y *Methylobacter* sp.). Adicionalmente, la producción recombinante de carotenoides también es posible, puesto que se conocen los genes implicados en la biosíntesis de carotenoides y se han expresado de manera heteróloga en diversas células huésped (por ejemplo, *E. coli*, *Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Methylobacter* sp.). Hasta hoy, algunas de estas demostraciones son adecuadas para producir un producto carotenoide en cantidades significativas de una manera de coste eficaz para uso industrial.

Los procedimientos para aislamiento de carotenoides a partir de bioorganismos productores de carotenoides se conocen en la técnica anterior, tal como la patente de EE. UU. 2011/0282083, la patente de EE. UU. 6,329,557 y la patente internacional WO01/55100.

La presente invención se refiere a un procedimiento mejorado para aislar un carotenoide a partir de un bioorganismo productor de carotenoides, así como a una formulación que comprende dicho carotenoide y el uso de dicha formulación sólida en productos de pienso (o premezclas).

Normalmente, estos bioorganismos producen carotenoide(s), compuesto(s) retinólico(s) u otros agentes lipófilos de moléculas pequeñas y acumulan el compuesto producido a más de o igual a un 1 % de su peso de células seco.

En el momento presente, el carotenoide se obtiene como sigue:

Después de que el bioorganismo ha acabado la producción del carotenoide, se aísla el carotenoide, se lava y después se formula además en la forma de aplicación deseada.

Sorprendentemente se ha encontrado que cuando se trata el carotenoide aislado al menos una vez con una etapa de lavado usando una disolución acuosa de un ácido de Brønsted, el carotenoide, que se obtiene, presenta mejores propiedades (tales como pureza de la forma cristalina, que da como resultado mejor formulación (emulsiones estables) debido al resto lipófilo menos indeseado del procedimiento).

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento (P) para el aislamiento de un carotenoide a partir de un bioorganismo productor de carotenoides que comprende las siguientes etapas:

- (i) extracción del carotenoide de la biomasa por al menos un disolvente (I) y
- (ii) opcionalmente al menos una etapa de lavado usando al menos un disolvente (II), que no es miscible con el disolvente (I) y
- (iii) opcionalmente secado de la disolución obtenida que comprende el carotenoide,

caracterizado porque después de la etapa (i) al menos se lleva a cabo una etapa de lavado usando una disolución acuosa de un ácido de Brönsted (etapa (i')), en donde el ácido de Brönsted se elige del grupo que consiste en ácido cítrico, ácido tartárico y ácido maleico.

5 El procedimiento de la invención se caracteriza por usar un ácido de Brönsted elegido del grupo que consiste en ácido cítrico, ácido tartárico y ácido maleico.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento (P_1) que es un procedimiento (P), en donde el ácido de Brönsted se elige de ácido cítrico, ácido tartárico y ácido maleico. Por lo tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento (P_2) que es un procedimiento (P), en donde el ácido de Brönsted es como se describió anteriormente.

10 Por lo tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento (P_3) que es un procedimiento (P), en donde el ácido de Brönsted se elige de los grupos que consisten en ácido cítrico, ácido tartárico y ácido maleico.

15 La concentración de la disolución acuosa del ácido de Brönsted en el procedimiento según la presente invención puede variar. La concentración de la disolución acuosa del ácido de Brönsted es normalmente hasta un 10 % en peso (% en peso), basado en el peso total de la disolución acuosa. Normalmente, la concentración del ácido de Brönsted es al menos un 0,01 % en peso, preferiblemente la concentración del ácido de Brönsted es de un 0,01 % a un 10 % en peso, más preferido de un 1 % a un 5 % en peso, basado en el peso total de la disolución acuosa.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento (P_4) que es un procedimiento (P), (P_1), (P_2) o (P_3), en donde la concentración de la disolución acuosa del ácido de Brönsted entre un 0,01 % y un 10 % en peso (% en peso), basado en el peso total de la disolución acuosa, preferiblemente de un 1 % a un 5 % en peso, basado en el peso total de la disolución acuosa.

20 El procedimiento según la presente invención puede llevarse a cabo de forma discontinua así como de manera continua. Dicha flexibilidad también es una gran ventaja.

El cristal obtenido presenta mejores propiedades que los obtenidos por los procedimientos según la técnica anterior.

25 La extracción (etapa (i)) normalmente se lleva a cabo a temperatura normal (20 °C – 25 °C). Pero también podía llevarse a cabo el procedimiento a temperatura superior o inferior (opcionalmente a presión). Preferiblemente, el procedimiento se lleva a cabo a una temperatura, que está por debajo del punto de ebullición del disolvente que se usa para la extracción.

Preferiblemente, la extracción del carotenoide de la biomasa se lleva a cabo en al menos un disolvente (etapa (i)). Este disolvente o mezcla de disolventes es preferiblemente inmiscible en agua. Los disolventes adecuados para la etapa (i) son, por ejemplo, CH_2Cl_2 , cloroformo, n-heptano y n-hexano.

30 Por lo tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento (P_5) que es un procedimiento (P), (P_1), (P_2), (P_3) o (P_4), en donde la extracción del carotenoide de la biomasa se lleva a cabo en al menos un disolvente (etapa (i)), que es inmiscible en agua.

35 Por lo tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento (P_6) que es un procedimiento (P), (P_1), (P_2), (P_3), (P_4) o (P_5), en donde la extracción del carotenoide de la biomasa se lleva a cabo en al menos un disolvente (etapa (i)), que se elige del grupo que consiste en CH_2Cl_2 , cloroformo, n-heptano y n-hexano.

La extracción (etapa (ii)) normalmente se lleva a cabo a temperatura normal (20 °C – 25 °C). Pero el procedimiento también podía llevarse a cabo a temperatura superior o inferior (opcionalmente a presión). Preferiblemente, el procedimiento se lleva a cabo a una temperatura, que está por debajo del punto de ebullición del disolvente que se usa para la extracción (para evitar el requerimiento del uso de presión).

40 La biomasa puede extraerse como tal o puede molerse la biomasa primero (y opcionalmente secarse) y después extraerse; puede secarse la biomasa (y opcionalmente molerse) y después extraerse o puede molerse la biomasa y extraerse de manera simultánea. También es posible combinar cualquiera de estos procedimientos.

45 El procedimiento según la presente invención también puede comprender una o más etapas de lavado adicionales. Esto no es un elemento esencial de la presente invención, pero puede mejorarse además la calidad del carotenoide obtenido. Dicha etapa de lavado (etapa (ii)) se lleva a cabo después de la etapa (i) y antes y/o después de la etapa (i'). La etapa de lavado se lleva a cabo con al menos un disolvente (II), que no es miscible con los disolventes (I) usados en la etapa (i).

50 Por lo tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento (P_7) que es un procedimiento (P), (P_1), (P_2), (P_3), (P_4), (P_5) o (P_6), en donde una o más etapas de lavado (etapa (ii)) se llevan a cabo después de la etapa (i) y antes y/o después de la etapa (i').

Finalmente, en la etapa (iii) la formulación puede secarse para obtener el carotenoide en una forma seca. Pero también es posible usar el carotenoide en un disolvente (o dispersarse en el disolvente de extracción).

También es posible que, después de la etapa de extracción (etapa (i)) se elimine el disolvente en una etapa adicional. Esto podría ser útil cuando se lleve a cabo todo el procedimiento de aislamiento, por ejemplo, en dos localizaciones diferentes y/o se almacene el material extraído antes de la siguiente etapa. El transporte, así como el almacenamiento es más simple sin ningún disolvente.

- 5 El bioorganismo produce carotenoide(s) (o también compuesto(s) retinólico(s) u otros agentes lipófilos de moléculas pequeñas) y se acumula el compuesto producido a más de o igual a un 1 % de su peso de células seco.

El término «bioorganismo», como se usa en la presente memoria, incluye, por ejemplo, bioorganismos de animal, mamífero, insecto, planta, hongo, levadura, alga, bacteria, cianobacteria, arqueobacteria y protozoarios. Los bioorganismos, que producen carotenoides, pueden ser naturales (como se pueden encontrar en la naturaleza) o puede modificarse. Los bioorganismos adecuados se conocen de la técnica anterior, es decir, de la patente internacional WO2006102342.

El término «carotenoide» se entiende en la técnica que se refiere a una clase estructuralmente diversa de pigmentos procedentes de compuestos intermedios de la ruta isoprenoide. La etapa de compromiso en la biosíntesis de carotenoides es la formación de fiteno a partir de pirofosfato de geranilgeranilo. Los carotenoides pueden ser acíclicos o cíclicos y pueden o no contener oxígeno, de manera que el término carotenoides incluye tanto carotenos como xantofilas. En general, los carotenoides son compuestos hidrocarbonados que tienen un esqueleto carbonado de polieno conjugado procedente formalmente del IPP compuesto de cinco carbonos, incluyendo triterpenos (diapocarotenoides C_{30}) y tetraterpenos (carotenoides C_{40}) así como sus derivados oxigenados y otros compuestos que son, por ejemplo, C_{35} , C_{50} , C_{60} , C_{70} , C_{80} de longitud u otras longitudes. Muchos carotenoides presentan fuertes propiedades absorbentes de luz y pueden variar en longitud en exceso de diapocarotenoides C_{200} - C_{30} consisten típicamente en seis unidades isoprenoides unidas de manera que la disposición de las unidades isoprenoides se invierte en el centro de la molécula para que los dos grupos metilo centrales estén en la relación de posición 1,6 y los grupos metilo no terminales restantes estén en una relación de posición 1,5. Dichos carotenoides C_{30} pueden proceder formalmente de la estructura $C_{30}H_{42}$ acíclica, con una cadena central larga de dobles enlaces conjugados por: (i) hidrogenación (ii) deshidrogenación, (iii) ciclación, (iv) oxidación, (v) esterificación/glucosilación o cualquier combinación de estos procedimientos. Los carotenoides C_{40} consisten típicamente en ocho unidades isoprenoides unidas de tal manera que la disposición de unidades isoprenoides se invierte en el centro de la molécula para que los dos grupos metilo centrales estén en una relación de posición 1,6 y los grupos metilo no terminales restantes estén en una relación de posición 1,5. Dichos carotenoides C_{40} pueden proceder formalmente de la estructura $C_{40}H_{56}$ acíclica, con una cadena central larga de dobles enlaces conjugados por (i) hidrogenación, (ii) deshidrogenación, (iii) ciclación, (iv) oxidación, (v) esterificación/glucosilación o cualquier combinación de estos procedimientos. La clase de carotenoides C_{40} también incluye algunos compuestos que surgen de reordenamientos del esqueleto carbonado o por la eliminación (formal) de parte de esta estructura. Se han identificado más de 600 carotenoides diferentes en la naturaleza.

Los carotenoides incluyen, pero no se limitan a: anteraxantina, adonirubina, adonixantina, astaxantina, cantaxantina, capsorubrina, β -criptoxantina, α -caroteno, β -caroteno, δ -caroteno, ϵ -caroteno, equinenona, 3-hidroxi equinenona, 3'-hidroxi equinenona, γ -caroteno, ψ -caroteno, 4-ceto- γ -caroteno, ζ -caroteno, α -criptoxantina, desoxiflexixantina, diatoxantina, 7,8-dideshidroastaxantina, dideshidrolipoceno, fucoxantina, fucoxantanol, isorenierateno, β -isorenierateno, lactucaxantina, luteína, licopeno, mixobactona, mimulaxantina, neoxantina, neurosporeno, hidroxineurosporeno, peridinina, fiteno, rodopina, rodopina glucósido, rodoxantina, 4-ceto-rubixantina, sifonaxantina, esferoideno, esferoidenona, espirilloxantina, toruleno, 4-ceto-toruleno, 3-hidroxi-4-ceto-toruleno, uriolida, acetato de uriolida, violaxantina, zeaxantin-p-diglucoído, zeaxantina y carotenoides C_{30} . Adicionalmente, los compuestos carotenoides incluyen derivados de estas moléculas, que pueden incluir grupos funcionales hidroxilo, metoxi, oxo, epoxi, carboxi o aldehídicos. Además, los compuestos carotenoides incluidos incluyen éster (por ejemplo, éster glicosilado, éster de ácido graso, acetilación) y derivados de sulfato (por ejemplo, xantofilas esterificadas). Preferiblemente, los carotenoides se seleccionan del grupo que consiste en astaxantina, derivados de astaxantina (tales como astaxantina esterificada), zeaxantina y derivados de zeaxantina (tales como zeaxantina esterificada).

Los carotenoides producidos según la presente invención pueden utilizarse en cualquiera de una serie de aplicaciones, por ejemplo, explotar sus propiedades biológicas o nutricionales (por ejemplo, antioxidante, etc.) y/o sus propiedades de pigmento. Por ejemplo, pueden usarse carotenoides en productos farmacéuticos (véase, por ejemplo, Bertram, Nutr. Rev. 57:182, 1999; Singh et al., Oncology 12:1643, 1998; Rock, Pharmacol. Titer. 75:185, 1997; Edge et al., J. Photochem Photobiol 41 :189, 1997; solicitud de patente de EE. UU. 2004/0116514; solicitud de patente de EE. UU. 2004/0259959), suplementos alimenticios (véase, por ejemplo, Koyama et al., J. Photochem Photobiol 9:265, 1991; Bauernfeind, Carotenoids as colorants and vitamin A precursors, Academic Press, NY, 1981; solicitud de patente de EE. UU. 2004/0115309; solicitud de patente de EE. UU. 2004/0234579), aplicaciones electroópticas, aditivos de piensos para animales (véase, por ejemplo, Krinski, Pure Appl. Chem. 66:1003, 1994; Polazza et al., Meth. Enzymol. 213 :403, 1992), cosméticos (como antioxidantes y/o como cosméticos, incluyendo fragancias; véase, por ejemplo, la solicitud de patente de EE. UU. 2004/0127554), etc. Los carotenoides producidos según la presente invención también pueden usarse como compuestos intermedios en la producción de otros compuestos (por ejemplo, esteroides, etc.).

Como ejemplos de aplicaciones farmacéuticas y/o para la salud, pueden ser útiles astaxantina y/o ésteres de la

misma en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, asma, dermatitis atópica, alergias, mieloma múltiple, arterioesclerosis, enfermedad cardiovascular, enfermedad hepática, enfermedad cerebrovascular, trombosis, enfermedades relacionadas con la neoangiogénesis, incluyendo cáncer, reumatismo, retinopatía diabética; degeneración macular y trastorno cerebral, hiperlipidemia, isquemia renal, diabetes, hipertensión, proliferación de tumores y metástasis y trastornos metabólicos. Adicionalmente, pueden ser útiles carotenoides y astaxantina en la prevención y el tratamiento de la fatiga, para mejorar la función renal en nefropatía de enfermedades inflamatorias, así como la prevención y el tratamiento de otras enfermedades relacionadas con los hábitos de vida. Aún más, se ha encontrado que la astaxantina desempeña una función como inhibidor de varios procedimientos biológicos, incluyendo inhibidores de la interleucina, inhibidores de la fosfodiesterasa, inhibidores de la fosfolipasa A2, inhibidores de la ciclooxigenasa-2, inhibidores de metaloproteínasa de matriz, inhibidores de la proliferación de células del endotelio capilar, inhibidores de la lipooxigenasa. Véase, por ejemplo, la publicación de patente japonesa núm. 2006022121, publicada 20060126 (solicitud de patente japonesa núm. 2005-301156 presentada 20051017); publicación de patente japonesa núm. 2006016408, publicada 20060119 (solicitud de patente japonesa núm. 2005-301155 presentada 20051017); publicación de patente japonesa núm. 2006016409, publicada 20060119 (solicitud de patente japonesa núm. 2005-301157 presentada 20051017); publicación de patente japonesa núm. 2006016407, publicada 20060119 (solicitud de patente japonesa núm. 2005-301153 presentada 20051017); publicación de patente japonesa núm. 2006008717, publicada 20060112 (solicitud de patente japonesa núm. 2005-301151 presentada 20051017); publicación de patente japonesa núm. 2006008716, publicada 20060112 (solicitud de patente japonesa núm. 2005-301150 presentada 20051017); publicación de patente japonesa núm. 2006008720, publicada 20060112 (solicitud de patente japonesa núm. 2005-301158 presentada 20051017); publicación de patente japonesa núm. 2006008719, publicada 20060112 (solicitud de patente japonesa núm. 2005-301154 presentada 20051017); publicación de patente japonesa núm. 2006008718, publicada 20060112 (solicitud de patente japonesa núm. 2005-301152 presentada 20051017); publicación de patente japonesa núm. 2006008713, publicada 20060112 (solicitud de patente japonesa núm. 2005-301147 presentada 20051017); publicación de patente japonesa núm. 2006008715, publicada 20060112 (solicitud de patente japonesa núm. 2005-301149 presentada 20051017); publicación de patente japonesa núm. 2006008714, publicada 20060112 (solicitud de patente japonesa núm. 2005-301148 presentada 20051017) y publicación de patente japonesa núm. 2006008712, publicada 20060112 (solicitud de patente japonesa núm. 2005-301146 presentada 20051017). Los carotenoides en la forma cristalina como se obtiene por el procedimiento según la presente invención pueden formularse además por métodos aplicados típicamente a los carotenoides. Por ejemplo, pueden usarse en formulaciones líquidas, gel-líquido o sólidas. Pueden formularse como emulsiones/dispersión o cualquier otra forma comúnmente conocida.

Por lo tanto, la presente descripción también se refiere al uso de los carotenoides obtenidos por el procedimiento según la presente invención como se describió anteriormente en la producción de productos alimenticios, piensos, productos farmacéuticos y/o productos para el cuidado personal.

Además, la presente descripción también se refiere al uso de al menos una formulación sólida como se describió anteriormente en la producción de una premezcla para productos alimenticios, piensos, productos farmacéuticos y/o productos para el cuidado personal.

Además, la presente descripción también se refiere a productos alimenticios, piensos, productos farmacéuticos y/o productos para el cuidado personal que comprenden al menos una formulación sólida como se describió anteriormente.

Además, la presente descripción también se refiere a premezclas (para productos alimenticios, piensos, productos farmacéuticos y/o productos para el cuidado personal) que comprenden al menos una formulación sólida como se describió anteriormente. Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención. Todas las partes y los porcentajes se refieren a peso.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se han preparado como se describe en la descripción.

Ejemplo 1: astaxantina acetilada

La biomasa (*Yarrowia lipolytica*) se extrajo con CH_2Cl_2 . La disolución así obtenida que comprendía la astaxantina acetilada se lavó con aproximadamente doble cantidad de agua desionizada. Se desechó la fase acuosa. Se repitió esta etapa de lavado.

La disolución así obtenida se lavó con una disolución acuosa (3% en peso) de ácido cítrico. Después se desechó la disolución de ácido cítrico.

La disolución así obtenida comprendía aproximadamente 1,6 % en peso (basado en el peso total de la disolución) de astaxantina acetilada.

Esta disolución se usó para formar una emulsión (con lignosulfonato como emulsionante). Esta emulsión fue estable también después de la eliminación del disolvente (orgánico) y secado por atomización.

Ejemplo 2: astaxantina acetilada

La biomasa (*Yarrowia lipolytica*) se extrajo con CH₂Cl₂.

Se dividió esta disolución en 3 porciones y se lavaron todas con ácido cítrico y después se combinaron las disoluciones y se lavaron de nuevo con ácido cítrico.

- 5 Esta disolución se usó para formar una emulsión (con lignosulfonato como emulsionante). Esta emulsión fue estable también después de eliminación del disolvente (orgánico) y secado por atomización.

Ejemplo 3 (ejemplo comparativo): astaxantina acetilada

La biomasa (*Yarrowia lipolytica*) se extrajo con CH₂Cl₂.

No se llevó a cabo etapa de lavado con ácido cítrico.

- 10 La disolución así obtenida se destinó a formar una emulsión (con lignosulfonato como emulsionante). Ni se obtuvo emulsión estable ni fue posible usar esta emulsión para más formulaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para el aislamiento de un carotenoide a partir de un bioorganismo productor de carotenoides que comprende las siguientes etapas:

(i) extracción del carotenoide de la biomasa por al menos un disolvente (I) y

5 (ii) opcionalmente al menos una etapa de lavado usando al menos un disolvente (II), que no es miscible con el disolvente (I) y

(iii) opcionalmente secar la disolución obtenida que comprende el carotenoide,

caracterizado porque después de la etapa (i) se lleva a cabo al menos una etapa de lavado usando una disolución acuosa de un ácido de Brönsted (etapa (i')) en donde el ácido de Brönsted se elige del grupo que consiste en ácido cítrico, ácido tartárico y ácido maleico.

10

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en donde la concentración de la disolución acuosa del ácido de Brönsted entre un 0,5 % y un 10 % en peso (% en peso), basado en el peso total de la disolución acuosa.

3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el procedimiento se lleva a cabo de forma discontinua o de manera continua.

15

4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la extracción (etapa (i)) normalmente se lleva a cabo a una temperatura por debajo del punto de ebullición del disolvente.

5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la extracción del carotenoide de la biomasa se lleva a cabo en al menos un disolvente inmiscible en agua.

20

6. Procedimiento según la reivindicación 5, en donde la extracción del carotenoide de la biomasa se lleva a cabo en al menos un disolvente elegido del grupo que consiste en CH_2Cl_2 , cloroformo, n-heptano y n-hexano.

7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde se llevan a cabo al menos etapas de lavado (etapa (ii)) después de la etapa (i) y antes y/o después de la etapa (ii).