



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105296552 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 03

(21) 申请号	201510631711. 3	<i>C11B 3/12</i> (2006. 01)
(22) 申请日	2013. 04. 15	<i>C11B 3/14</i> (2006. 01)
(30) 优先权数据		<i>A61K 8/99</i> (2006. 01)
	1253496 2012. 04. 16 FR	<i>A61K 8/97</i> (2006. 01)
	1253614 2012. 04. 19 FR	<i>A61K 8/31</i> (2006. 01)
(62) 分案原申请数据		<i>A61Q 19/00</i> (2006. 01)
	201380020310. 3 2013. 04. 15	<i>C12R 1/89</i> (2006. 01)
(71) 申请人	罗盖特兄弟公司	
地址	法国莱斯特朗	
(72) 发明人	菲利普·卢腾 塞缪尔·帕蒂尼尔 迈克尔·佩吕 文森特·佩吕	
(74) 专利代理机构	中原信达知识产权代理有限 责任公司 11219	
代理人	杨青 缙正煜	
(51) Int. Cl.		
	<i>C12P 7/64</i> (2006. 01)	
	<i>B01D 11/04</i> (2006. 01)	
	<i>C11B 1/10</i> (2006. 01)	
	<i>C11B 1/02</i> (2006. 01)	
	<i>C11B 3/00</i> (2006. 01)	
	<i>C11B 3/06</i> (2006. 01)	

权利要求书1页 说明书18页

(54) 发明名称

用于精炼微藻产生的角鲨烯的方法

(57) 摘要

本发明涉及用于精炼微藻产生的角鲨烯的方法,更具体而言,涉及一种用于制备组合物的方法,该组合物通过微生物发酵产生,有着非常丰富的角鲨烯。该方法的特征在于它包括选自下组的一个纯化步骤,该组包括:在有提取回流的多级逆流分馏柱中进行的超临界的CO₂提取,以及短路径分子蒸馏。

1. 一种用于制备具有高角鲨烯含量的组合物的方法,该组合物是通过发酵微生物产生,该方法特征在于它包括由以下组成的粗制油纯化步骤:在逆流操作的有提取回流的多级分馏柱中用超临界的 CO_2 提取。

2. 如权利要求 1 所要求的方法,其特征不在于这些微生物是属于破囊壶菌目物种家族的微藻。

3. 如权利要求 2 所要求的方法,其特征不在于属于破囊壶菌目物种家族的微藻是以下物种的微藻:裂殖壶菌属物种、*Aurantiochytrium* 属物种以及破囊壶菌属物种。

4. 如权利要求 2 所要求的方法,其特征不在于它包括以下步骤:

1) 制备属于破囊壶菌目家族的微藻的生物物质,

2) 处理该生物物质,以获得包含至少 10wt% 角鲨烯、优选地是至少 15wt% 角鲨烯的粗制油,

3) 在逆流操作的有提取回流的多级分馏柱中,在超临界的压力下,通过接触一种流体分馏由此获得的粗制油,以产生具有 70% 和 75% 之间的角鲨烯含量的提取物以及具有少于 1.5% 角鲨烯的提余液,

4) 在与步骤 3) 中相同的在逆流操作的有提取回流的多级分馏柱中,在超临界的压力下,使由此获得的提取物接触一种流体,以获得 95wt% 和 99wt% 之间的角鲨烯含量,

5) 收集由此获得的角鲨烯组合物。

5. 如权利要求 4 所要求的方法,其特征不在于该逆流操作的多级分馏柱是规整填充柱。

6. 如权利要求 4 所要求的方法,其特征不在于将在步骤 3) 中采用的在超临界压力下的流体提高到 10 和 50MPa 之间、并且优选地是 15 和 25MPa 之间的压力,并提高到 40℃ 和 80℃ 之间的温度。

7. 如权利要求 4 所要求的方法,其特征不在于将在步骤 4) 中采用的在超临界压力下的流体提高到 10 和 30MPa 之间、并且优选地是 10 和 20MPa 之间的压力,并提高到 40℃ 和 80℃ 之间的温度。

8. 如权利要求 4 所要求的方法,其特征不在于在超临界压力下的流体是纯二氧化碳。

9. 通过权利要求 1-8 中任一项获得的角鲨烯组合物在化妆品、药物和医学领域中的用途。

10. 用于通过氢化高纯度角鲨烯组合物制备富含角鲨烷的组合物的方法,该高纯度角鲨烯组合物是通过进行权利要求 1 到 8 所述的任一种方法获得的。

11. 权利要求 10 所述的角鲨烷组合物在化妆品领域中的用途。

用于精炼微藻产生的角鲨烯的方法

[0001] 本申请为国际申请日 2013 年 4 月 15 日、国际申请号 PCT/FR2013/050812 于 2014 年 10 月 16 日进入中国国家阶段、申请号 201380020310.3、发明名称“用于精炼微藻产生的角鲨烯的方法”的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及用于精炼通过发酵产生的角鲨烯的方法，该方法始于微生物，更具体地始于微藻，甚至更具体地始于破囊壶菌目物种家族的那些。

[0003] 在本发明的意义，“破囊壶菌目物种家族的微藻”意指属于物种裂殖壶菌属物种、*Aurantiochytrium* 属物种和破囊壶菌属物种的微藻。

背景技术

[0004] 角鲨烯是存在于所有高等生物中的一种脂质，并且是动物和植物甾醇激素以及一些维生素（例如维生素 D）的常见前体。

[0005] 它存在于许多细胞膜中，从而为它们提供流动性。

[0006] 这种不饱和直链烃是具有三十个碳原子和五十个氢原子的类异戊二烯，具有式：2, 6, 10, 15, 19, 23- 六甲基 -2, 6, 10, 14, 18, 22- 二十四碳六烯， $C_{30}H_{50}$ ，即它由 6 个全部处于反式构象的异戊二烯单元组成。

[0007] 像所有的萜烯一样，它是由异戊基焦磷酸酯形成，异戊基焦磷酸酯与二甲基烯丙基焦磷酸酯偶联以相继提供香叶基焦磷酸酯、然后是法呢基焦磷酸酯，在角鲨烯合成酶的作用下，两个分子的法呢基焦磷酸酯在被 NADPH 还原后缩合以形成角鲨烯。

[0008] 在植物和许多微生物中，这种途径与其他代谢途径共存，产生八氢番茄红素，八氢番茄红素是叶绿素、类胡萝卜素和胶乳中的萜烯的前体。

[0009] 角鲨烯及其在末端双键处环氧化的衍生物拥有被转化的特性，归因于值得注意地区域选择性和立体选择性地酶（环化酶）特化到具有相当大的结构变异的多环三萜烯：真核生物中藁烯和里白醇的和原生动物中的四膜虫醇（五环三萜烯）；酵母、真菌和哺乳动物中的羊毛甾醇和植物中的环羊毛甾醇（四环三萜烯）。

[0010] 角鲨烯的应用

[0011] 角鲨烯一直被使用，尤其是在日本，作为食品补充剂。

[0012] 此外，是一个日本化学家，三丸辻本 (Mitsumaru Tsujimoto)，在 1906 年发现了它并在 1916 年确定它的结构。

[0013] 它被认为是一种有效的抗氧化剂，在天然药物中具有许多有益特性。

[0014] 它的常规用途包括化妆品，虽然更常见地使用它的氢化的衍生物——未被氧化的角鲨烷，并因此不会变得腐臭。

[0015] 当具有高纯度，结合刺激免疫系统的佐剂时，角鲨烯已经并且现在仍然被用在某些疫苗中：以“水包油”乳剂的形式，它充当表面活性剂，从而增加该疫苗的响应。

[0016] 它被用在靶向新出现的病毒（例如 H5N1 和 H1N1）的实验性疫苗中，但尤其与季节

性流感的抗原相结合,用在自 1997 年以来给予的 2200 万剂的组合物中(MF59,以 10mg/剂 FLUAD®的比率),没有严重接种后反应。

[0017] 目前对于某些不包含使免疫系统能够采用适当的防御机制的信号的疫苗(灭活或亚单位疫苗)来说,添加佐剂、角鲨烯或铝盐(自 1926 年以来使用的)是必要的。

[0018] 角鲨烯避免了重复注射的需要以确保良好保护。

[0019] 角鲨烯的这些用途加强了本领域的普通技术人员具有用于生产高纯度的角鲨烯的安全方法的决心。

[0020] 此外,这种品质可以在医学领域中开发其他应用路线。

[0021] 在未来,在某些癌症或者在 HIV 类型的病毒性疾病的治疗中,角鲨烯与核苷类似物的化学偶联可能会因此构成一个相当大的进步。

[0022] 角鲨烯的各种来源

[0023] 角鲨烯常规地是从深海鲨鱼肝脏中提取。

[0024] 然而,肝脏积累大量的有毒化合物,例如重金属(包括汞)和其他脂溶性毒素。

[0025] 毒理学研究表明,按照在化妆品中使用的浓度,角鲨烯及其氢化形式角鲨烷是无毒的并且对人类皮肤无刺激或不致敏。

[0026] 然而,当用于医学领域中,尤其是作为疫苗佐剂时,角鲨烯的纯度水平是至关重要的。

[0027] 因此具有角鲨烯的高品质、无杂质(痕量金属,尤其是汞和其他毒素)是绝对有必要的。

[0028] 除了从鲨鱼肝提取外,在文献中还提出了用于生产角鲨烯的几个路线。

[0029] 作为第一替代方案,它可以从橄榄油、棕榈油,以及从其他谷类油或来源于苋菜、种子、米糠、以及小麦胚芽的油中分离。

[0030] 然而,此处的主要缺点是从这些提取的是极少量的角鲨烯,大约 0.1 到 0.7wt%,并且需要很多费力的和昂贵的纯化步骤。

[0031] 作为第二替代方案,首先提出了从微生物中生产角鲨烯的方法,并且更具体地是从天然酵母或重组酵母,尤其是酵母属类型。

[0032] 因此,已知酿酒酵母能够生产角鲨烯,但量很小:大约 0.041mg/g 生物质(BHATTACHARJEE, P. (巴特查尔吉, P.) 等人,2001, World J. Microb. Biotechnol. (《世界微生物学和生物技术期刊》), 17, 第 811-816 页)。

[0033] 因此通过基因重组尝试了对这些生产的能力的优化。

[0034] 然而,如医学领域(作为用于疫苗的佐剂的纯度超过 97%的角鲨烯的生产)的专利申请 WO 2010/023551 所呈现的,只有超额生产(按超过 15wt%干细胞计)角鲨烯的重组酵母是可用的,这种第一替代方案才可以工业应用。

[0035] 现在,获得这些重组细胞需要应用大量费力、漫长而复杂的代谢工程步骤,通过采用分子生物学的工具,导致对角鲨烯生物合成途径的刺激和对角鲨烯分解代谢途径的抑制。

[0036] 事实上,如所述专利申请 WO 2010/023551 另外回忆的,多个基因参与角鲨烯的生物合成:包括甲羟戊酸激酶、磷酸甲羟戊酸激酶、焦磷酸甲羟戊酸脱羧酶、焦磷酸异戊烯酯异构酶、HMG(3-羟基-3-甲基戊二酰-CoA 还原酶)和角鲨烯合成酶。

[0037] 对于分解代谢途径,编码参与角鲨烯至麦角甾醇转变的众多酶的基因包括:角鲨烯单加氧酶(ERG1)、羊毛甾醇合成酶、C14-二甲基化酶、d14-还原酶、C4-甲基氧化酶、C4-脱羧酶(ERG26)、3-酮还原酶、C24-甲基转移酶、C8-异构酶、C5-脱饱和酶、d22-脱饱和酶和d24-还原酶。

[0038] 另外,还必须考虑到其他分解代谢酶:LEU2([β]-异丙基苹果酸脱氢酶)、氧化角鲨烯环化酶、酵母甾醇-24-甲基转移酶和麦角甾-5,7,24(28)-三烯甘油酯-22-脱氢酶。

[0039] 作为从鲨鱼肝脏中进行提取的方法的第三替代方案,提出了用于从尤其是破囊壶菌目家族(包括破囊壶菌属、*Aurantiochytrium* 属和裂殖壶菌属),更特别地 *Schizochytrium mangrovei* 或裂殖壶菌的微藻生产角鲨烯的有前景的方法。

[0040] 此外,这些微藻在异养条件下(无光;提供葡萄糖作为含碳源)生产角鲨烯,并且可以因此容易地由微生物发酵领域普通技术人员操作。

[0041] 然而在这些破囊壶菌目家族的微藻中,角鲨烯是感兴趣的其他脂类化合物的副产物,例如二十二碳六烯酸(或DHA), ω 3家族的一种多不饱和脂肪酸。

[0042] 因此看上去,角鲨烯尤其被描述为DHA的商业油类(除胡萝卜素和甾醇类之外)的不可皂化部分的组分之一。

[0043] 为了比较,*Schizochytrium mangrovei* 的FB1菌株以按细胞干重的6.2%的比率生产DHA,对于角鲨烯是0.017%。

[0044] 因此,这些自然生产角鲨烯的微生物以小量生产角鲨烯:

[0045] -对于破囊壶菌 ACEM 6063(参见 LEWIS(刘易斯)等人, *Mar. Biotechnol.* (《海洋生物技术》),2001,第439-447页),大约0.1mg/g 生物质,

[0046] -对于 *Schizochytrium mangrovei* FB1(参见 JIANG(江)等人, *J. Agric. Food Chem.* (《农业食品化学期刊》),2004,52,第1196-1200页),大约0.162mg/g 生物质。

[0047] 然而,通过发酵优化生产,这个领域的专家已成功地生产大约:

[0048] -1mg 至 1.2mg 角鲨烯 /g 破囊壶菌 ACEM 6063 生物质(参见 Qian Li(钱李)等人, *J. Agric. Food Chem.* (《农业食品化学期刊》),2009,57,4267-4272 或 LEWIS(刘易斯)等人,在 *Mar. Biotechnol.* (《海洋生物技术》),2001,3,439-447 中)。

[0049] -0.72mg 角鲨烯 /g 裂殖壶菌属 生物质(参见 G. CHEN(G. 陈)等人, *New Biotechnology* (《新生物技术》),2010,27-4,第382-389页)。

[0050] -0.53mg 角鲨烯 /g *Aurantiochytrium mangrovei* FB31 生物质(参见 K. W. FAN(K. W. 凡)等人, *World J. Microbiol. Biotechnol.* (《世界微生物学生物技术期刊》),2010,26-3,第1303-1309页)。

[0051] -1.17 $\pm$ 0.6mg 角鲨烯 /g *Schizochytrium mangrovei* 生物质(参见 C-J YUE(C-J 越)和 Y. JIANG(Y. 江), *Process Biochemistry* (《加工生物化学》),2009,44,923-927)。

[0052] 申请人也促成通过破囊壶菌目物种家族的微藻生产角鲨烯的进一步改善,提供以先前在这一领域的文献中从未达到的水平生产角鲨烯的方法,即至少8g 角鲨烯 /100g 的生物质(在其审查下的法国专利申请中)。

[0053] 因此,尽管破囊壶菌目物种家族的微藻现在允许生产数额可观的角鲨烯,仍然需要精炼以满足食品、化妆品以及尤其医疗需求。

[0054] 在文献中提出了一定数量的纯化角鲨烯的方法,但这些方法通过本领域的普通技

术人员的改变以用于常规来源的角鲨烯生产（动物、植物或酵母类型的微生物）。

[0055] 通常单独或结合采用四个主要技术：

[0056] - 结晶、

[0057] - 层析、

[0058] - 蒸馏或

[0059] - 使用超临界的流体（例如超临界的 CO_2 ）提取。

[0060] 如将在下面解释的，最后提到的这两个技术是最常遇到的那些。

[0061] 为了纯化植物来源的角鲨烯，例如在专利申请 US 2003/130532 中，要求保护了一种用于从植物油中提取不皂化的物质的方法，该方法包括至少一个皂化步骤（通过该步骤所述油被转化为一种水性醇溶液）、用一种有机溶剂如氯 -1- 丁烷对该水性醇溶液进行的一个逆流提取步骤、共产生的这些甾醇和 / 或三萜烯醇的一个结晶步骤以及最终的通过蒸馏分离角鲨烯。

[0062] 优选地是，处理的植物油是一种鳄梨油或大豆油。

[0063] 在国际专利申请 WO 2010/004193 中，也从植物开始，避免有机溶剂的使用，例如，描述了一个用于从植物油的脱臭的蒸馏物中提取甾醇、维生素 E、角鲨烯和其他碳氢化合物的总体方法。

[0064] 在游离脂肪酸酯化并且然后与相同的“短”醇合并的脂肪酸（甘油酯和甾体）的酯基转移后，三次连续的蒸馏允许连续回收以下各项：碳氢化合物，然后是烷基酯，并且最后是最重的带有角鲨烯的烷基酯。

[0065] 该第三个蒸馏物从而用于生产角鲨烯，角鲨烯将从残余碳氢化合物的一个第一馏分与一个第二部分馏分中分离。

[0066] 来自该第三蒸馏的残余物将用于生产甾醇和维生素 E。

[0067] 因此，该方法使得可能不用任何石油起源的溶剂而提取这四种不可皂化物质中的每种，并且可能标出通过天然物理和化学方法获得的产品的标示量。

[0068] 然而，正如上面所提到的，提取植物角鲨烯的这些方法仍是难以外推到工业规模的方法，这归因于有毒溶剂的使用，或归因于没有吸引力的价格。

[0069] 关于用于纯化通过酿酒酵母类型的微生物生产的角鲨烯的方法，常规地，他们采用溶剂提取的方法。

[0070] 第一个提取步骤通常是在细胞裂解后回收的脂质上用甲醇 / 氯仿 (2:1) 进行的，随后是层析步骤。

[0071] 就其本身而言，用超临界的 CO_2 提取通常是优选的，以最小化有机溶剂的使用，如例如在 BHATTACHARJEE (巴塔查尔吉) 和 SINGHAL (辛格尔) 在 World Journal of Microbiology (《世界微生物学杂志》) 和 Biotechnology (《生物技术》), 2003, 19-6, 第 605-608 页的文章中所述的。

[0072] 也有许多文章或专利描述了这一技术的应用，尤其是用于提取植物来源的角鲨烯（例如自棕榈油的专利申请 JP 2005/087998，或自橄榄油的 US 2004/0015033）。

[0073] 国际专利申请 WO 94/026683 呈现了用于从橄榄油残余物生产角鲨烯的一种方法和一种设备。

[0074] 该方法包括以下四个步骤：这些脂肪酸的皂化、破碎、酯化以及用超临界的流体进

行的提取。

[0075] 然而,对于用超临界的流体进行的提取,使用了提前用金属催化剂酯化的一种产物,然后将其喷洒到配备有变温区域的高压提取塔中。

[0076] 这些方法和设备使得可以获得可销售的、纯度超过 90% 的角鲨烯,但难以有吸引力的成本外推到工业规模。

[0077] 非常少的文献描述了用于精炼由微藻产生的角鲨烯的优选方法。

[0078] 例如,我们可以发现 LU(陆)等人发表在 Journal of Chromatography(《层析术杂志》),2003,994,37-43 上的科学文章,该文章颂扬了高速逆流层析术用于由破囊壶菌属 ATCC 26185 产生的角鲨烯的制备性分离和纯化的优点。

[0079] 根据这些作者,这种技术具有提出了一种方法的优点,该方法比更加常规的 HPLC(高效液相层析)更加高效得多,因为它提出了不用固体支撑的单一液体/液体层析分配(并因此没有通过对所述固体支撑的不可逆吸附而损失材料)。

[0080] 然而,如在本文中详细描述,这种方法只能在实验室规模设想,而且另外需要用甲醇/氯仿进行提取的预备步骤。

[0081] 在现有技术水平,已开展了用超临界的流体提取的一些初步工作,用于葡萄藻(Botryococcus braunii)、斜生栅藻(Scenedesmus obliquus)或德尔布有孢酵母(Torulaspora delbrueckii)。

[0082] 然而,建议的操作条件也很难转移到工业规模。

[0083] 就本申请人的知识所及,使用超临界流体技术或分子蒸馏类型技术,没有适用于工业应用的用于精炼由微藻生产的角鲨烯的有效方法真的可由本领域的普通技术人员触及。

[0084] 急于发展用于精炼由微藻产生的角鲨烯的有效方法,申请人开展其自身的研究并且成功地适用了用超临界流体提取并且通过分子蒸馏进行的这些技术,以保证角鲨烯水平超过 95%、优选超过 97%、甚至大约 100%。

[0085] 该水平的纯度可以使得不仅在医学领域能够使用如此获得的角鲨烯,而且还设想其容易氢化为角鲨烷以用于化妆品应用。

发明内容

[0086] 因此,本发明涉及一种用于制备具有高角鲨烯含量的组合物的方法,该角鲨烯是通过发酵微生物产生,该方法特征在于它包括选自下组的纯化步骤,该组由以下各项组成:在逆流操作的有提取回流的多级分馏柱中用超临界的 CO₂ 进行提取,以及所谓的“短路径”分子蒸馏。

[0087] 这些微生物优选地是属于破囊壶菌目物种家族的微藻,甚至更优选地是属于裂殖壶菌属物种、Aurantiochytrium 属物种和破囊壶菌属物种的微藻。

[0088] 在本发明的意义上,“具有高鲨烯含量的组合物”意指具有超过 95wt%、优选地是超过 97wt%、甚至更优选地是大约 100wt% 的角鲨烯含量的一种组合物。

[0089] 用超临界的 CO₂ 进行的两个连续提取步骤的执行。

[0090] 在根据本发明的方法的这个第一优选实施例中,进行了一种方法,该方法特征在于它包括以下步骤:

- [0091] 1) 制备属于破囊壶菌目家族的微藻的生物质，
- [0092] 2) 处理该生物质，以获得包含至少 10wt%角鲨烯、优选地是至少 15wt%角鲨烯的粗制油，
- [0093] 3) 在逆流操作的有提取回流的多级分馏柱中，在超临界的压力下，通过接触一种流体分馏由此获得的该粗制油，以产生具有 70%和 75%之间的角鲨烯含量的提取物以及具有少于 1.5%角鲨烯的提余液，
- [0094] 4) 在与步骤 3) 中相同的在逆流操作的有提取回流的多级分馏柱中，在超临界的压力下，使由此获得的提取物接触一种流体，以获得 95wt%和 99wt%之间的角鲨烯含量，
- [0095] 5) 收集由此获得的角鲨烯组合物。
- [0096] 这个第一优选实施例的第一步骤由以下组成：制备属于破囊壶菌目家族的微藻的生物质。
- [0097] 作为属于破囊壶菌目家族的微藻，例如以下商业菌株是可用的：
- [0098] - 参考号为 ATCC 20888 的裂殖壶菌属、
- [0099] - 参考号物 ATCC PRA 276 的 *Aurantiochytrium* sp.。
- [0100] 此外，本申请人还拥有自己生产的菌株，一种裂殖壶菌属物种，于 2011 年 4 月 14 日存放在法国巴斯德研究所的国家微生物保藏中心 [National Collection of Cultures of Microorganisms]，编号 CNCM I-4469，并且还存放在中国武汉大学的中国典型培养物保藏中心，中国武汉 430072，编号 M 209118。
- [0101] 该培养在异养条件下进行。通常，该培养步骤包括预培养步骤（为了使该菌株复苏），然后是适当的培养或发酵步骤。最后提到的步骤对应于感兴趣的脂质化合物的生产步骤。
- [0102] 这些微藻的培养条件在本领域是熟知的。
- [0103] 例如，在 G. CHEN (G. 陈) 在 *New Biotechnology* (《新生物技术》)，2010, 27-4, 第 382-389 页中的文章中，找到了包括以下连续步骤的方法：
- [0104] - 从维持在琼脂营养培养基上的菌株开始，该琼脂营养培养基包括葡萄糖、谷氨酸一钠、酵母提取物和多种微量元素，
- [0105] - 在定轨搅拌器上的锥形烧瓶中进行预培养，条件为 pH 为 6 温度为 25℃，以获得复苏的生物质，
- [0106] - 使用如在预培养中所用的相同的培养基，取大约为 0.5% (v/v) 的前一生产步骤中获得的生物质接种另一系列的生产锥形烧瓶，并且保持温度为 25℃。
- [0107] 这个第一优选实施例的第二步骤由以下组成：处理该生物质，以获得包含至少 10wt%角鲨烯、优选地是至少 15wt%角鲨烯的粗制油。
- [0108] 可通过本领域的普通技术人员另外已知的任何方法进行这些处理，并且可从上述的菌株 CNCM I-4469 获得至少 10wt%的角鲨烯含量。
- [0109] 如将在下面给出的实例中描述的，本申请人建议：
- [0110] - 用脱矿质水将该生物质调整到 6 和 12%之间的干物质含量，优选地是到 10 和 12%之间的干物质含量，
- [0111] - 使用碱性蛋白酶类型的一种酶处理由此获得的生物质，以破坏所述微藻的细胞壁，

[0112] - 向该反应混合物（处于水包油乳剂的形式）中添加超过 5% (v/v)、优选地是约 10% (v/v) 的乙醇，

[0113] - 离心由此获得的反应混合物，以从水相中分离该油，

[0114] - 回收富含角鲨烯的油状上部的相。

[0115] 这种富含被理解为至少 10wt%、优选地是至少 15wt% 的角鲨烯含量。

[0116] 这个第一优选实施例的第三步骤由以下组成：在逆流操作的有提取回流的多级分馏柱中，在超临界的压力下，通过接触一种流体分馏由此获得的该粗制油，以产生具有 70% 和 75% 之间的角鲨烯含量的提取物以及具有少于 1.5% 角鲨烯的提余液。

[0117] 就本申请人所知的，使用逆流操作的有提取回流的多级分馏柱提取角鲨烯的这个具体形式总体上从未被开发用于通过微生物发酵产生的角鲨烯及具体地用于属于破囊壶菌目家族的此类型的微生物的微藻。

[0118] 因此，申请人利用在超临界压力下在二氧化碳中角鲨烯（非极性烃）和构成该油的脂质的甘油三酯之间的大的溶解度的差异（角鲨烯比甘油三脂更加易溶）。

[0119] 为此，申请人发现使用逆流操作的有提取回流的多级分馏柱（该柱配备有规整填充）出乎意料地使能够实现相对于起始油有优异产率的高纯度的角鲨烯。

[0120] 本领域的普通技术人员已知，在超临界的压力下用一种流体提取导致具有非常高品质的提取物。

[0121] 在超临界压力下采用流体的方法的主要优点之一是在溶剂（该流体）和提取物以及溶质之间易进行分离，如已在众多出版物以及在法国专利 FR 2584618 的实施部分的某些重要方面中描述的。

[0122] 超临界流体的其他重要的优点之一是它们针对一种混合物的各组分的“可适应”选择性。

[0123] 这种非常高的选择性与超临界流体（并且具体地是在超临界压力下的二氧化碳的那些）的具体特性相关联：溶解能力可能受该流体的压力和温度的变化的精细控制。

[0124] 申请人已证实，“温和的”条件是随着溶解能力的降低该溶剂变得越来越有选择性时的最具有选择性。

[0125] 因此，申请人建议优选使用纯二氧化碳，而不是添加将增加其溶解能力的共溶剂。

[0126] 此外，选择 10 和 50MPa 之间的操作压力，优选地是 15 和 25MPa 之间，以及 40°C 和 80°C 之间的温度。

[0127] 在超临界压力下的流体被泵在高压下泵出，并在以保持恒定的且显示在质量流量计上的流速注入该柱的底部之前，在热交换器中升高到所希望的温度。

[0128] 原料是通过规整填充该柱中间的高压泵（节段 1 和 2、或 2 和 3、或 3 和 4 之间，从该柱的底部开始计数），以保持恒定且显示在质量流量计上的流速注入的。

[0129] 装载有该提取物的流体在该柱的顶部离开，之后被部分地减压到 6MPa 并送到几个分离的节段中，尤其包括串联安装的旋风分离器，在护层中通过水循环加热该分离器的本体。

[0130] 在这些分离器的底部回收该液体提取物，而将处于气态的流体然后照惯例再循环：在冷却到 0 到 5°C 的冷凝器中冷凝，在缓冲瓶中进行中间存储（通过供应来自外部存储槽的新鲜流体而将该缓冲瓶的液体水平保持恒定），在高压下泵出并加热到所希望的温

度。

[0131] 通过受水平传感器控制的膨胀阀在该柱的底部取出提余液,以此保持该柱的下部中的油液界面;为了避免不利于柱中分馏的压力颠簸,以两个串联的沉淀槽收集该提余液,在第一个沉淀槽中的压力被维持在一个比该柱中占优势的压力低的、小于约 1 到 4MPa 的值。

[0132] 从而这些槽允许没有颠簸地取回该提余液而最小化溶解在该提余液中的流体损失。

[0133] 如本申请人所示,分离流体和液体原料之间的多阶段逆流接触的使用允许所使用的流体的这种选择性的最佳利用。

[0134] 此外,提取物回流对分馏操作的整体选择性的改善作出了显著贡献。

[0135] 此处产生提取物回流并且通过沿着该柱建立热梯度而谨慎地进行控制,当后者的直径允许向壁的良好传热时,一方面该流体接触原料并且另一方面在分成几个独立的节段的护套中进行热水循环以允许应用这个梯度。

[0136] 事实上,在固定在从临界压力(即 7.4MPa)到 30MPa 变化的区域的超临界压力下,大部分有机化合物在二氧化碳中的溶解度当温度增加时降低;因此,当流体在柱中与油逆流上升时,可以将其加热,以此造成该提取物的部分及其与油混合的回流的分层。

[0137] 如果使用具有大于 200mm 的直径的柱时,向壁的传热变得不充分,并且优选采用外部提取物回流,通过对离开该柱的流体进行部分减压而在该柱的顶部分离该提取物的部分,然后通过泵对液体提取物的该馏分进行减压并在该柱的顶部注入。

[0138] 此外,在超临界压力下的流体具有优异的热质传递特性,远比液体的那些更好,促成观察到的优异选择性。

[0139] 这个第一优选实施例的第四步骤由以下组成:在与步骤 3) 中相同的在逆流操作的有提取回流的多级分馏柱中,在超临界的压力下,使由此获得的提取物接触一种流体,以获得 95wt% 和 99wt% 之间的角鲨烯含量。

[0140] 角鲨烯富集的步骤是在类似于前述步骤的那些的条件下但在稍微不同的压力和温度条件下进行的。

[0141] 因此选择在 10 和 30MPa 之间的、此处优选地是 10 和 20MPa 之间的操作压力,以及 40°C 和 80°C 之间的温度。

[0142] 这个第一优选实施例的第五步骤最终由以下组成:收集由此获得的角鲨烯组合物。

[0143] 如将在下面给出的实例中解释的,以此纯化的组合物可具有大于或等于 97% 的角鲨烯含量。

[0144] 分子蒸馏的应用

[0145] 在根据本发明的方法的一个第二优选实施例中,进行了一种方法,其特征在于它包括以下步骤:

[0146] 1) 制备属于破囊壶菌目家族的微藻的生物质,

[0147] 2) 处理该生物质,以获得包含至少 10wt% 角鲨烯、优选地是至少 15wt% 角鲨烯的粗制油,

[0148] 3) 任选地通过脱胶、脱酸、漂白和脱臭的一系列步骤,精炼由此获得的粗制油,

[0149] 4) 通过所谓的“短路径”分子蒸馏提取该角鲨烯,以获得具有超过 60wt%、优选地是超过 80wt%的角鲨烯含量的轻馏分,

[0150] 5) 通过皂化、二相分离、洗涤、漂白和脱臭的一系列步骤精炼这一轻馏分,以获得具有 95%和 100%之间的角鲨烯含量的提余液,

[0151] 6) 收集由此获得的角鲨烯组合物。

[0152] 根据本发明的方法的这个第二优选实施例的第一和第二步骤与以上所示的第一优选实施例的第一和第二步骤相同。

[0153] 由此获得的粗制油由甘油酯(主要是甘油三酯)、不可皂化的物质(主要是角鲨烯)以及可任选的小比例的游离脂肪酸和磷脂。

[0154] 在通过分子蒸馏提取角鲨烯之前,这种粗制油可能先前经历粗精炼。

[0155] 可设想以下步骤中的一个或多个:

[0156] - 脱胶:其允许在酸介质中通过沉淀去除磷脂;

[0157] - 脱酸:其通过使用一种碱提供对这些游离脂肪酸的中和;

[0158] - 漂白:常规用活性炭进行;

[0159] - 脱臭:通过真空蒸馏,所谓的蒸汽“剥离”。

[0160] 这些精炼步骤是在植物油的精炼中常用的步骤。

[0161] 根据本发明的方法的这个第二优选实施例的第四步由以下组成:通过所谓的“短路径”分子蒸馏提取该角鲨烯,以获得具有超过 60wt%、优选地是超过 80wt%的角鲨烯含量的轻馏分,

[0162] 该粗制油的角鲨烯(任选地精炼的)是通过分子蒸馏提取的。

[0163] 对于高真空,低于 0.1 毫巴,角鲨烯的沸点是大约 200℃。

[0164] 这种高真空使得能够限制该温度并且因此限制该角鲨烯的降解/聚合风险。

[0165] 此外,该停留时间被保持很短,少于一分钟。

[0166] 在这种压力-温度-接触时间方案中,甘油三酯馏分(高分子量)不是挥发性的。

[0167] 因此,本申请人发现在这些情况下,所谓的“短路径”分子蒸馏是特别适合用于分离这两种馏分(主要是甘油三酯和角鲨烯)的技术。

[0168] 本申请人建议的操作条件如下。

[0169] 从氮惰性供应槽中,通过有从 25℃到 100℃变化的温度自动控制的一个第一回路将该油泵到排气器(去除痕量的水和溶剂)。

[0170] 在排气器出口,通过有处于 50℃到 150℃的温度范围的温度自动控制的一个回路将该油泵入(“短路径”)蒸发室。

[0171] 在从 150℃到 250℃的范围中调节该蒸发器的温度。

[0172] 该冷凝器被控制在从 0 至 50℃的温度范围中。

[0173] 在从 10^{-2} 到 10^{-4} 毫巴的范围中调节该蒸发室的压力。

[0174] 通过这些收集回路将主要包含角鲨烯的蒸馏物和主要包含甘油三酯的残余物运送到惰性的储存槽中。

[0175] 该蒸馏物的轻馏分中的角鲨烯含量超过 60wt%,优选地是超过 80wt%。

[0176] 根据本发明的方法的这个第二优选实施例的第五步骤由以下组成:通过皂化、二相分离、洗涤、漂白和脱臭的一系列步骤精炼这一轻馏分,以获得具有 95%和 100%之间的

角鲨烯含量的提余液。

[0177] 事先进行皂化,以水解在蒸馏期间可能夹带的残余的甘油酯,但还为了水解酯化的甾醇。

[0178] 然后在接下来的步骤中,将更容易去除后者(处于游离形式(更具极性的))。

[0179] 在约 80℃ 的温度下用乙醇苛性钾进行持续从 0.5 到 2h 的时间的皂化。

[0180] 在冷却后,然后可通过倾析或离心来分离从皂化中产生的混合物的两相。

[0181] 乳化很可能会使分离更复杂;然后添加水可以促进分离。

[0182] 乙醇相不仅浓缩了游离脂肪酸而且浓缩了所产生的极性杂质的比例。油相浓缩了角鲨烯。

[0183] 用水洗涤在皂化之后分离的角鲨烯相。

[0184] 可进行若干连续的洗涤。

[0185] 碱性水(经苛性钾或苏打处理的)可以用来带走在第一洗涤循环(一个或多个)中残余的皂化杂质。

[0186] 当来自用水进行的洗涤的上清液处于中性 pH 时,洗涤完成。

[0187] 在每个循环之间,通过倾析或离心分离各相(洗涤水和角鲨烯)。

[0188] 在这个阶段,角鲨烯馏分是从甾醇以及残余的甘油酯(甘油单、二、三酯)的部分中纯化的。

[0189] 在此阶段,为了减少浅黄色的颜色,可进行另外的漂白步骤。

[0190] 这一漂白步骤是在活性炭上进行,类似于在植物油精炼中常规使用的漂白。

[0191] 角鲨烯馏分的精炼以脱臭步骤终止。

[0192] 脱臭是通过在真空下持续从 0.5 至 1h 的时间的热(150℃ -200℃)蒸汽“剥离”进行的。

[0193] 在受控制的气氛(理想地是用氮惰化的)下储存因此纯化的角鲨烯。

[0194] 添加抗氧化剂可有利于这一馏分的稳定。

[0195] 本发明还涉及通过进行根据本发明的方法获得的一种角鲨烯组合物在化妆品、药物和医学领域中的用途。

[0196] 本发明进一步涉及用于通过氢化高纯度角鲨烯组合物(通过进行根据本发明的方法获得的)制备富含角鲨烷的组合物,连同该角鲨烷组合物在化妆品领域中的用途。

具体实施方式

[0197] 从以下给出的实例中本发明将被更好地理解,提供这些实例是为了说明的目的并且是非限制性的。

[0198] 实例 1. 通过在 20 升发酵罐中发酵属于破囊壶菌目家族的微藻来制备包含至少 10wt% 角鲨烯的一种油

[0199] 这个实例说明了用于提取一种富含角鲨烯的油的方法,该富含角鲨烯的油是通过发酵属于本申请人的裂殖壶菌属微藻(于 2011 年 4 月 14 日存放在法国巴斯德研究所的国家微生物保藏中心 [National Collection of Cultures of Microorganisms], 编号 CNCM I-4469) 产生的。

[0200] 此处,在适于 20 升反应器的培养 / 生产相之前,以两个连续的初步的预培养相进行发酵。

[0201] 对于这些实验,在第一预培养介质中进行维生素的添加,但是在第二个预培养介质中和在生产中添加维生素是任选的。

[0202] 然后该预培养介质具有以下表 I 和 II 中显示的组成:

[0203] 表 I

[0204]

第一预培养介质	%
葡萄糖	3
酵母提取物	0.4
谷氨酸钠	6.42
NaCl	1.25
MgSO ₄	0.4
KCl	0.05
CaCl ₂	0.01
NaHCO ₃	0.05
KH ₂ PO ₄	0.4
维生素混合物	0.14
微量元素	0.8

[0205] 表 II

[0206]

第二预培养介质	%
葡萄糖	8.57
谷氨酸钠	6.42
酵母提取物	0.64
NaCl	2
KH ₂ PO ₄	0.64

MgSO ₄	2.29
CaCl ₂	0.03
NaHCO ₃	0.03
Na ₂ SO ₄	0.03
维生素混合物	0.14
微量元素	0.2

[0207] 通常以 1m/l 使用 Clerol“FBA3107”消泡剂。任选地,使用 50mg/l 的青霉素 G“钠盐”以阻止污染菌的生长。

[0208] 葡萄糖用 KH₂PO₄灭菌(与剩下的介质分离地),因此避免形成沉淀物(磷酸镁铵)。在灭菌过滤之后添加维生素混合物和微量元素。培养/生产介质的组成在下表 III 中给出。

[0209] 表 III

[0210]

	%
在 T0 添加葡萄糖	7.5
尿素	1
酵母提取物	1.2
NaCl	0.25
KH ₂ PO ₄	0.96
MgSO ₄	1.2
CaCl ₂	0.12
NaHCO ₃	0.12
KCl	0.08
添加维生素混合物	0.4
微量元素	0.56

[0211] 维生素混合物的组成和微量元素的组成在以下表 IV 和 V 中给出:表 IV

[0212]

维生素混合物	g/L
--------	-----

B1	45
B6	45
B12	0.25

[0213] 表 V

[0214]

微量元素	g/L
MnCl ₂ · 2H ₂ O	8.60
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.2
NiSO ₄ · 6H ₂ O	7.50
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.15
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	5.70
CuSO ₄ · 5H ₂ O	6.50
FeSO ₄ · 7H ₂ O	32.00
ZnCl ₂	1.50

[0215] 预培养条件

[0216] 第一预培养在 500ml 的配备有挡板的锥形烧瓶中进行, 向该烧瓶中添加一滴由 COGNIS GmbH Düsseldorf 公司销售的 CLEAROL FBA3107 消泡剂。

[0217] 在其组分完全溶解之后过滤培养介质, 任选地以 0.25mg/l 的比率补充青霉素 G “钠盐”。

[0218] 通过挑取在皮氏培养皿中培养的微藻菌落 (以一个 10 μl 接种环的比率) 进行接种。

[0219] 孵育花费 24 至 36 小时, 温度为 28°C, 以 100rpm 搅拌 (在一个轨道式搅拌器上)。

[0220] 随着生物质倾析 (或者粘附在壁上), 在将该锥形烧瓶搅拌均匀之后我们小心取出 3 至 5ml。

[0221] 对于第二次预培养, 使用了 2 升的配备有挡板和管道系统的锥形烧瓶。

[0222] 将一滴消泡剂和酵母提取物添加至 100ml 水中。

[0223] 在溶解于 300ml 的脱矿质水之后, 将介质的所有组分过滤。可以任选地添加青霉素 G “钠盐”并且在灭菌之前事先向锥形烧瓶中添加一滴消泡剂。

[0224] 然后用 3 至 5ml 第一次预培养物进行接种。

[0225] 在 28°C 下再进行 24 至 36 小时孵育, 在 100rpm 下搅拌。

[0226] 在 20 升反应器中生产

- [0227] 在 20 升反应器中如下进行适当培养。
- [0228] - 对该反应器中的一部分进行介质灭菌,并且与另一部分分开,以避免形成沉淀物,
- [0229] - 用在第二次预培养结束时产生的生物质进行接种,比率为 0.5% v/v 的培养介质,
- [0230] - 培养维持在 30℃。
- [0231] - 氧转移速率固定在 35-40mmol/l/h,
- [0232] - 以 0.2 至 0.3VVM 通气,
- [0233] - 最初 pH>5.5,
- [0234] - 一旦浓度 >20% 就补充葡萄糖,以维持葡萄糖浓度在 15 和 70g/l 之间。
- [0235] 下表 VI 显示了用本申请人的裂殖壶菌属物种获得的结果。
- [0236] 表 VI :
- [0237]

测试	E
预培养的温度 (°C)	28
培养温度 (°C)	30
在培养结束时的角鲨烯滴定度 (g/l)	4.4
生物质 (g/l)	54
角鲨烯对干生物质, g/100g	8.2

- [0238] 生物质回收
- [0239] 将生物质从该发酵罐中去除,并通过连续的两个浓缩系列(通过离心进行)从间质可溶性物质中洗涤(5 分钟,5000g),并稀释该生物质(以 1/3V 球粒 /V 水的比率)。
- [0240] 干细胞浓度对总粗制干物质是 95%。
- [0241] 然后用蒸馏水将该干物质调节至 12%。
- [0242] 获得富含角鲨烯的粗制油
- [0243] 将洗涤的生物质在配备有推进器和挡板的 2 升发酵罐型(例如由国际科学(Interscience)公司销售的那些)的实验反应器中进行搅拌。
- [0244] 这个系统使得可以限制所产生的细胞溶解产物的乳化而允许良好混合,这对于分解酶的作用是必不可少的。
- [0245] 温度被调节为 60℃,并且 pH 被苏打控制到约 8。
- [0246] 这些条件对于以 1% /s 水平添加的枯草杆菌蛋白酶(Alcalase enzyme,诺维信公司)的活性是最佳的。
- [0247] 溶菌时间被固定在 4h。
- [0248] 在溶菌最后,向该反应混合物(水包油乳剂)中添加 10%乙醇($V_{\text{乙醇}}/V_{\text{溶解产物}}$),将其搅拌另外 15min。

[0249] 在 12000g 下将该溶解产物离心 5 分钟。因此提取包含角鲨烯的油,其在表面具有相移。

[0250] 实例 2:通过在 1m³发酵罐中发酵属于破囊壶菌目家族的微藻来制备包含至少 10wt%角鲨烯的一种油

[0251] 从在 1m³发酵罐(发酵条件类似于实例 1 中的那些)中进行的生产开始,通过供应 Flottweg S3E Sédicantur(澄清器)的 SEEPEX 正排量泵从该发酵罐中提取该生物质。

[0252] 以此方式,该生物质被浓缩为 200g/l。

[0253] 用脱碳酸的水在 1m³槽中稀释该浓缩物(1 体积水 / 体积浓缩物)并且然后通过如前述的相同操作再次浓缩,以获得 620kg 生物质,洗涤并浓缩至 110g/l。

[0254] 在 1m³槽中在 150rpm 下搅拌该生物质并且加热至 60℃。

[0255] 然后用 45%的苛性钾调节 pH 至 8。

[0256] 以 1%(/ 干生物质)的水平添加来自 NOVO 的酶枯草杆菌蛋白酶 2.4L FG。这些溶菌参数被维持 6h。

[0257] 用光学显微镜并且通过样品离心(2min,10000g)监测溶菌的质量。

[0258] 在溶菌最后,伴随搅拌向维持在 60℃的槽中添加 60l 的乙醇(约 10%体积 / 体积)。

[0259] 以与实例 1 中相同的方式,然后温度再次升高到 80℃,并且然后在 ALPHA LAVAL CLARA 20 离心单元(配置为具有 3 个出口的浓缩器模式)上进行离心。

[0260] 这个配置特别适合于固体 / 液体 / 液体类型的三相混合物的分离。

[0261] 以 9600rev/min 旋转使得能够达到约 10000g。

[0262] 使用正排量泵以 100 至 400l/h 的流速提供对细胞溶解产物的给料。

[0263] 通过在重相出口控制反压力,移动重相和轻相之间的界面。

[0264] 将自动脱泥的频率调节至 2 至 15min 的频率。

[0265] 因此以多于 50%的产率回收 13kg 富含角鲨烯的粗制油。

[0266] 实例 3:通过分子蒸馏提取角鲨烯

[0267] 包含 21.8%角鲨烯的粗制油是通过从根据实例 2 制备的微藻生物质中提取而获得的。

[0268] 从氮惰化的进料槽,在 120℃的温度下以 3.5kg/h 将 8kg 油泵入排气器中。

[0269] 在排气器出口,通过维持在 85℃的一个回路,该油经过(“短路径”)蒸发室。将该蒸发器的温度调节至 220℃。

[0270] 将该冷凝器调节到从 20℃的温度。该蒸发室中产生最大真空度(<10³毫巴)。

[0271] 通过这些收集回路将包含角鲨烯的蒸馏物和包含甘油三酯的残余物运送到惰性的储存槽中。在此阶段,回收约 1.5kg 的蒸馏物和 6kg 的残余物。

[0272] 该蒸馏物中的角鲨烯含量(基于 NMR 分析的重量百分比)等于 94%。

[0273] 该残余物的角鲨烯含量低于 2%。

[0274] 精炼操作的顺序此处是从 10g 如上所述的通过分子蒸馏提取的角鲨烯的一个样品开始。

[0275] 皂化操作是在包含苛性钾(2N)的介质中进行的,该介质维持比率 1/2(m_油 / m_{乙醇苛性钾}),具有乙醇溶剂(比率 9/1(m_{乙醇} / m_水))。

- [0276] 该皂化介质被维持在回流 80℃ 下 45min。
- [0277] 因此游离脂肪酸的含量从 0.29 增加至 3.1 (g_{油酸等效物} / % g_油)。
- [0278] 这些游离脂肪酸是从酯化的甾醇的水解部分地衍生的。
- [0279] 通过离心 (10min, 25000g) 分离该部分乳化的皂化混合物的两相。
- [0280] 用添加了少量苛性钾的水洗涤提取的油相 (角鲨烯) (比率 3/1 (m_水 / m_油))。
- [0281] 用清水重复洗涤直至获得处于中性 pH 的上清液。
- [0282] 通过离心 (在 25000g 下, 持续 10min), 在每个洗涤步骤之间进行分离。
- [0283] 在此阶段获得 70% 产率的 7g 角鲨烯。
- [0284] 伴随搅拌用活性炭漂白通过皂化而纯化的馏分 (5% / 油), 并且然后通过过滤以 0.2 μm 分离活性炭。
- [0285] 通过在真空下在 180℃ 蒸汽剥离进行脱臭的最终步骤, 持续 30min。
- [0286] 由此获得的纯化的角鲨烯具有近 98% 的纯度。
- [0287] NMR 分析的清晰度不允许获得纯度的精确值但允许评价杂质去除速率在 75% 左右。
- [0288] 实例 4. 通过用超临界的 CO₂ 进行两个连续步骤的提取精炼角鲨烯
- [0289] 这使用 200 升的油, 该油包含多于 15% 的从接近于实例 1 和 2 的操作条件下培养在 10m³ 发酵罐中的裂殖壶菌属藻类产生的角鲨烯。
- [0290] 该油更具体地包含甘油三酯, 主要有脂肪酸:
- [0291] -C14、C16 短链, 达 27%,
- [0292] -C20 并且尤其是 C22 长链, 达 43%, 以及
- [0293] 此外大量的、不可皂化的、主要由角鲨烯 (约 15.5%) 组成的物质。
- [0294] 目标一方面是获得纯化为超过 95% 的角鲨烯并且另一方面是获得已从中去除角鲨烯的一种油。
- [0295] 因此根据本发明采用的分馏方法包括两个步骤, 这两个步骤可被总结为如下:
- [0296] - 步骤 1: 通过在超临界的压力下接触一种流体分馏该粗制油, 产生富含角鲨烯的提取物以及不含角鲨烯的提余液;
- [0297] - 步骤 2: 通过分馏在步骤 1 中获得的提取物 (通过在超临界的压力下接触一种流体) 纯化角鲨烯。
- [0298] 该分馏基于角鲨烯 (非极性烃) 和构成该油的脂质的甘油三酯之间的大的溶解度的差异 (角鲨烯远比甘油三酯更易溶)。
- [0299] 这两个分馏步骤是在逆流操作的有内部提取回流的填充的分馏柱中进行。
- [0300] 采用的分馏单元被配备有一个具有 125mm 内径和 8m 高度的逆流分馏柱, 允许以 4 个节段, 每个节段 2m 建立温度梯度。
- [0301] 该柱被高性能填料 (Sulzer BX 型) 填充。该单元是高度自动化的并且提供连续操作。
- [0302] 步骤 1: 处理该粗制油以提取角鲨烯
- [0303] 将该油给料到节段 3 和 4 (从该柱的底部计数) 之间的柱中。这些工艺参数在下表 VII 中示出。
- [0304] 表 VII

[0305]

角鲨烯的纯化	步骤1
压力 (巴)	200
这4个节段的温度 (°C)	40/50/50/72
CO ₂ 流速 (kg/h)	185
原料的流速 (kg/h)	5
溶剂水平 (kgCO ₂ /kg油)	37
收集的馏分	提取物提余液
馏分/原料	20% (提取物) 80% (提余液)
角鲨烯含量	72% (提取物)

[0306] 因此在相对高浓度的提取物中回收角鲨烯。

[0307] 处理该粗制油使得能够提取大部分的角鲨烯。

[0308] 步骤2:角鲨烯的纯化:

[0309] 在类似于对该粗制油使用的那些条件但在具有如下表 VIII 中所示的稍微不同的压力和温度条件下再一次进行角鲨烯的超临界分馏。

[0310] 表 VIII

[0311]

角鲨烯的纯化	步骤 2
压力 (巴)	175
这 4 个节段的温度 (°C)	40/50/50/72
CO ₂ 流速 (kg/h)	200
原料的流速 (kg/h)	5
溶剂水平 (kgCO ₂ /kg 油)	40
收集的馏分	提取物
馏分 / 原料	58%

角鲨烯含量	97%
-------	-----

[0312] 用超临界的 CO₂采用两个连续提取步骤的这一方法使得能够确保获得一种具有 97%的角鲨烯含量的组合物。