(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 05 435 T2** 2005.09.22

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 306 444 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 05 435.0**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/ES01/00284**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 951 706.9**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 02/010429**
(86) PCT-Anmeldetag: **18.07.2001**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **07.02.2002**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.05.2003**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **08.09.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **22.09.2005**

(51) Int Cl.[7]: **C12P 23/00**
A23L 1/275

(30) Unionspriorität:
200001792 19.07.2000 ES

(73) Patentinhaber:
Vitatene, S.A., Leon, ES

(74) Vertreter:
Patentanwälte von Kreisler, Selting, Werner et col., 50667 Köln

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR

(72) Erfinder:
COSTA PEREZ, Javier, E-28080 Leon, ES; ESTRELLA CASTRO, Antonio, E-28080 Leon, ES; MARCOS RODRIGUEZ, Ana Teresa, E-28080 Leon, ES; GONZALEZ DE PRADO, J. Emiliano, E-28080 Leon, ES; PEIRO CEZON, Enrique E., E-28080 Leon, ES; COLLADOS DE LA VIEJA, Alfonso, E-28080 Leon, ES; ESTEBAN MORALES, Manuel, E-28080 Leon, ES

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON BETA-KAROTIN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues Verfahren zur Herstellung von Carotinoiden, insbesondere β-Carotin, aus Submerskulturen von Mucor-Pilzen der Gattung Blakeslea. Es werden ein Fermentationsverfahren, das den Erhalt einer Erhöhung der Herstellung von β-Carotin und dessen relativer Konzentration in Bezug auf andere Carotinoide, bezogen auf die Einarbeitung in das Kulturmedium Sojalecithin, ermöglicht, sowie eine Strategie einer definierten pH-Wert-Regelung während der Fermentation offenbart.

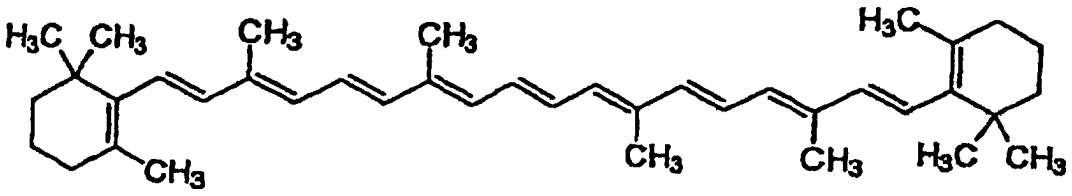
[0002] Auf vergleichbare Weise offenbart die vorliegende Erfindung ein optimiertes Verfahren zur Reinigung und Isolierung von kristallinem β-Carotin mit hoher Reinheit aus der Fermentation zuvor erhaltener Kulturflüssigkeit mittels einer Vereinfachung des Reinigungsverfahrens und einer Erhöhung der isolierten Ausbeute unter Verwendung von Lösungsmitteln, die als "natürlich" betrachtet werden, und/oder denjenigen, die in Klasse III der ICH (International Conference of Harmonization) eingeschlossen sind.

Stand der Technik

[0003] Carotinoide sind häufig in Gemüsepflanzen, der Hauptquelle, aus der sie erhalten wurden, vorhanden. Sie sind aufgrund ihrer Eigenschaften als Antioxidantien und als Vorstufen für Vitamin A Gegenstand zahlreicher Untersuchungen gewesen. Sie stellen die umfangreichste Gruppe von natürlichen Pigmenten dar, die in der Natur existieren. Sie werden in der Industrie als Nahrungsmittelzusatzstoffe und farbgebende Mittel in Margarinen, Ölen, Saucen, Suppen etc. verwendet. (L. Ninet und J. Renaut, 1979, in: N. J. Peppler, D. Perlman (Hrsg.) Microbial Technology, 2. Aufl., Band 1, Academic Press, NY, S. 529 – 544).

[0004] Bei den Carotinoiden handelt es sich um Isoprenoide, die eine charakteristische Polyenkette aus konjugierten Doppelbindungen enthalten, die von einer Kondensation zweier Geranylgeranyl-Vorstufen stammen (Pfander (1992). Meth. Enzimol.). Es handelt sich dabei um zwei Gruppen von Pigmenten: Carotinen und deren oxidierte Derivate, die Xanthophylle.

[0005] Die empirische Molekularformel von β-Carotin ist $C_{40}H_{56}$, die Molmasse ist 536,85, und es weist die nachfolgend dargestellte Formel auf:



trans-β-Carotin

[0006] Die Herstellung von β-Carotin als Verbindung mit hoher Reinheit ist an eine Reaktion der klassischen chemischen Synthese gebunden gewesen, deren Verfahren heutzutage Gegenstand einer Kontroverse sind, weil alternative, von natürlichen Quellen ausgehende, unter Fermentation erfolgende oder von Naturstoffen mit Extraktionsverfahren, bei denen weniger drastische Lösungsmittel und Reaktionsbedingungen eingesetzt werden, ausgehende Wege für vorteilhafter gehalten werden.

[0007] Carotinoide und andere Terpenderivat-Komponenten im Allgemeinen und β-Carotin im besonderen können aus natürlichen Quellen, ob von pflanzlichen Produkten wie der Tomate und der Karotte, in denen sie in sehr kleinen Prozentwerten vorkommen, oder ausgehend von Kulturen ausgewählter Algen, Pilze etc., in denen sich der Anteil dieser Komponenten erhöhen kann, erhalten werden.

[0008] Verfahren zum Erhalt von Ölharzen, die reich an Carotinoiden und β-Carotin sind, aus Pflanzen, Ölen oder Algen sind in verschiedenen Patenten beschrieben.

[0009] In den meisten Fällen ist bei den beschriebenen Extraktionsverfahren eine Stufe des Mahlens/Extrudierens der Frucht erforderlich, um die Extraktion des Lösungsmittels und die Freisetzung des intrazellulären, an β-Carotin reichen Gehalts zu erleichtern.

[0010] Das Extraktionsverfahren für diese Komponenten sollte die relativ geringe Konzentration und deren spezielle Ansammlung in intrazellulären Agglomeraten berücksichtigen. Als Ergebnis sind für die Extraktion von β-Carotin geeignete Verfahren erforderlich, die eine Löslichmachung des Produkts entweder durch eine Penetration der Zellwände oder durch ein vorheriges Zerreißen der Zellwände unter Freisetzung des intrazellulären Inhalts ermöglichen.

[0011] Die in US 3 268 606, US 2 959 522 beschriebenen Verfahren nutzen halogenierte Lösungsmittel wie Dichlormethan, Chloroform etc. oder aromatische Kohlenwasserstoffe: Benzol, Toluol etc., die Probleme einer inhärenten Toxizität aufweisen, was bedeutet, dass sie in die Gruppen I und II des Guide for Residual Solvents of Use in Pharmaceutical or Food Application eingeschlossen sind, wonach es empfehlenswert ist, diejenigen zu verwenden, die zur Gruppe der Klasse III gehören.

[0012] Bei den meisten der Verfahren zur Extraktion von β-Carotin aus Algen werden Öle verwendet. Diese Verfahren sind nicht zum Erhalt von β-Carotin in kristalliner Form, sondern stattdessen zum Erhalt von Ölextrakten wie denjenigen geeignet, die in den U.S.-Patenten 4 680 314, US 4 713 398, US 5 019 668, US 5 378 369 beschrieben sind, wobei β-Carotin löslich gemacht und als solches vertrieben wird.

[0013] Die Verwendung von überkritischem CO_2 ist durch die geringe Löslichkeit von β-Carotin eingeschränkt. Die Verwendung anderer Lösungsmittel unter Druck unter überkritischen Bedingungen oder als verflüssigte Gase ist in Betracht gezogen worden. Beispiele umfassen Propan oder Ethylen, in denen die Löslichkeit höher ist. Trotzdem würde die Verwendung dieser Kohlenwasserstoff-Lösungsmittel die Verwendung von β-Carotin in der Lebensmittelindustrie erschweren.

[0014] Alternativ kann β-Carotin aus der Fermentationsflüssigkeit bestimmter Mucor-Pilze wie Phycomyces, Blakeslea etc. erhalten werden, die gegenüber den oben erwähnten natürlichen Quellen den Vorteil einer erhöhten Konzentration dieser Verbindung in Bezug auf die Menge an trockener Biomasse sowie einer möglichen Erhöhung der Erzeugung durch die Verwendung von superproduzierenden Stämmen, die durch klassische Mutagenesetechniken oder mittels Molekularbiologie erhalten werden, oder mittels einer Optimierung des Fermentationsverfahrens unter Verwendung komplexer Rohstoffe, bestimmter Induktoren der Erzeugung oder Inhibitoren der Erzeugung anderer, strukturell verwandter Carotinoide, wodurch deren Erzeugung vermieden wird, aufweisen.

[0015] Bei jedem der Verfahren zur Herstellung von β-Carotin mit dem Pilz B. trispora werden Mischkulturen verwendet, weil viel höhere Ausbeuten an β-Carotin als bei der Verwendung von einzelnen Kulturen der Stämme (+) und (–) erhalten werden (A. Ciegler, 1965, Advan. Appl. Microbiol. 7: 19) und US 5 422 247.

[0016] Dem Fermentationsmedium von β-Carotin sind als Ersatz für β-Ionon, ein chemisches Stimulans des Biosynthese-Stoffwechselwegs, dem Fermentationsmedium von β-Carotin, Zitronenpulver zugegeben worden [A. Ciegler, 1965, Adv. Appl. Microbiol, 7, 1 – 34]. Die Zugabe von zuvor mit Alkali behandelten Zitronenderivaten ermöglichte eine Erhöhung des Gehalts an β-Carotin auf 1,7 g/l [Upjohn Co., 1965. Niederländisches Patent 65/00 788].

[0017] Eine analytische Studie, die auf die Identifizierung des stimulierenden Faktors oder der stimulierenden Faktoren der Erzeugung von in Zitronenpulvern enthaltenem β-Carotin abzielte, ergab, dass neben einer kleinen Menge an Äpfelsäure sowie einer dritten, nicht identifizierten Säure, deren Rf demjenigen von Gluconsäure oder 2-Ketogluconsäure ähnlich ist, Citronensäure die Hauptkomponente ist. Diese Studie kam zu dem Schluss, dass die Funktion von Citronensäure bei der Erhöhung der Erzeugung nicht spezifisch ist und dass sie als Vorstufe früher Metaboliten im Biosynthese-Stoffwechselweg dienen könnte. Darüber hinaus wurden 42 % Kohlenhydrate gefunden, von denen es sich bei 50 % um Saccharose und beim Rest um reduzierende Zucker handelte (Glucose und Fruktose) [Z. Pazola, A. Ciegler, H. N. Hall, 1996. Nature 5043:1367 – 1368].

[0018] Bei Lecithinen handelt es sich um Verbindungen mit einer Glycerophosphatidylcholin-Struktur, die in allen lebenden Organismen (Pflanzen und Tieren) vorkommen und signifikante Bestandteile von Nerven- und Gehirngewebe darstellen. Sie sind farblose Substanzen mit einem öligen Griff, die bei etwa 60 °C schmelzen und sich beim Erwärmen knapp über 100 °C zersetzen. Das Lecithinmolekül besteht aus einer Mischung von Diglyceriden von Stearinsäure, Palmitinsäure und Ölsäure, die an den Cholinester von Phosphorsäure gebunden sind. Weil das Molekül von dipolarer Beschaffenheit ist, wird es als Tensid und essbares Emulgiermittel natürlichen Ursprungs extensiv verwendet und in der allgemeinen Nahrungsmittelindustrie (Schokolade, Margarine etc.), Diätetik, der pharmazeutischen Industrie und der Kosmetikindustrie extensiv eingesetzt [T. E. Furia (Hrsg.) CRC Handbook of Food Additives, 2. Aufl., Cleveland: The Chemical Rubber Co., 1972. 879]. Kom-

merziell erhältliches Lecithin stammt hauptsächlich von Sojabohnen und wird als Nebenprodukt bei der Herstellung von Sojabohnenöl erhalten, obwohl es auch aus Zuckermais und anderen pflanzlichen Samen erhalten werden kann [G. G. Hawley, The Condensed Chemical Dictionary. 9. Auflage. New York: Van Nostrand Reinhold Co., 1977. 509]. Sojalecithin enthält 11,7 % Palmitinsäure, 55 % Linolensäure, 5,5 % C20-C22-Säuren (einschließlich Arachidonsäure) [The Merck Index. 9. Aufl., Rahway, New Jersey: Merck & Co., Inc., 1976. 712].

[0019] Die Auswirkung von Sojalecithin auf die Fermentierung ist hauptsächlich in Bezug auf seine Verwendung in Futtermitteln als Phospholipid-Zusatz und die Auswirkung auf die Fermentation von Rumen, mit einer Wirkung auf die Verdaulichkeit von Fetten und Serumstriglycerid und Cholesterin-Konzentrationen bei Kälbern und Schafen (T. C. Jenkins, T. Jiménez und D. I. Cross (1989) "Influence of phospholipids on ruminal fermentation in vitro and on nutrient digestion and serum lipids in sheep" J. Anim Sci 67(2): 529 – 537; T. C. Jenkins und N. Fotouhi (1990) "Effects of lecithin and corn oil on site of digestion, ruminal fermentation and microbial protein synthesis in sheep", J. Anim. Sci. 68(2): 460 – 466; T. C. Jenkins (1990) "Nutrient digestion, ruminal fermentation and plasma lipids in steers fed combinations of hydrogenated fat and lecithin" J. Dairy Sci., 73(10): 2934 – 2939) sowie bei der Milcherzeugung in Kühen (S. F. Abel-Caines, R. J. Grant und M. Morrison (1998) "Effect of soybean hulls, soy lecithin and soapstock mixtures on ruminal fermentation and milk composition in dairy cows" J. Dairy Sci. 81(2): 462 – 470) untersucht worden.

[0020] Bei der Erzeugung von Mildiomycin mittels einer Fermentation von Actinomycetes wurde in einigen Fällen nach der Einarbeitung von Komponenten mit N-Methyl-Beschaffenheit (insbesondere Trimethylammoniumgruppen), unter anderem Cholin, Betain, Lecithin, Tetramethylammonium etc. oder von Naturstoffen, die reich an diesen Verbindungen sind, oder sogar von einer Kombination von beiden zur Vermeidung einer möglichen Überdosis anderer Komponenten des fraglichen Naturstoffs in das Kulturmedium eine beträchtliche Erhöhung der Produktion gefunden [US 4 334 022].

[0021] Andere in den 80-er Jahren entwickelte Patente betreffen die Einarbeitung von Lecithin zur Begünstigung des Fermentationsvorgangs in fettfreien Sojabohnenschalen mit dem Ziel, deren Verarbeitungs- und Aufschlussleichtigkeit [JP 58116648] sowie ihre aktivierende Wirkung auf die Kultur von in der Lebensmittelbearbeitung verwendeten Mikroorganismen [DE 3546511; EP 0 223 161] zu verbessern. Andererseits ist die emulgierende Beschaffenheit dieser Verbindung bei Anwendungen zur Eliminierung von Ölen durch Mikroben [DE 149056] oder bei der enzymatischen Behandlung von organischen Abflüssen aus Abfällen [EP 0 421 223] und bei der Bildung von Kompost aus Rückständen mit einem hohen Fettgehalt [JP 7033570] erwogen worden.

[0022] In einer Anmeldung jüngeren Datums ist Lecithin auch zur Verbesserung des Kulturmediums des Pilzes Lagenidium giganteum verwendet worden, wodurch ein stärkeres Wachstum und auch eine höhere Effektivität als biologisches Mückenbekämpfungsmittel aus dem unter solchen Bedingungen inkubierten Pilz ermöglicht [WO 98/58049].

[0023] In US 2 959 521 wird β-Carotin durch das Kultivieren von B. trispora in einem Lecithin als Antioxidans enthaltenden Nährmedium hergestellt, wodurch die Erzeugung von β-Carotin stimuliert wird.

[0024] Bei der Herstellung von β-Carotin durch die Fermentierung von Blakeslea trispora ist die Verwendung einiger Tenside (wie Span 20, Sorbitanmonolaurat, SIGMA) zur Verstärkung der Produktion durch das Zulassen eines dispersen Wachstums des Myzels beschrieben worden (Kim Seon-Won, Seo Weon-Taek und Young-Hoon Park (1997) "Enhanced production of β-carotene from Blakeslea trispora with Span 20" Biotechnology Letters 19(6): 561 – 562). Eine Wirkung auf das Verhältnis des Gehalts an erzeugtem β-Carotin in Bezug auf andere, ebenfalls in den Kulturen von Blakeslea trispora vorhandenen Carotinen (γ-Carotin, β-zea-Carotin etc.) wird jedoch nicht beschrieben.

[0025] Die bis heute beschriebenen Verfahren zum Erhalt von β-Carotin aus Fermentationsflüssigkeiten implizieren gewöhnlich eine Extraktionsstufe und aufeinander folgende Kristallisationen und Umkristallisationen und sogar Stufen einer chromatographischen Reinigung, die aufgrund der Beschaffenheit dieser Substanzen, der niedrigen Löslichkeit dieser Substanzen, einen hohen Lösungsmittelverbrauch bedingen (US 53 105 54; EP 0 242 148, US 3 369 974, Biochemistry and Molecular Biology International, 39, 1077 – 1084 (1996)), und oft sind die Reinheiten des erhaltenen Produkts übermäßig gering.

[0026] Darüber hinaus erschweren die normalerweise verwendeten Lösungsmittel Dichlormethan, Chloroform, Hexan, Benzol oder Toluol aufgrund ihrer Toxizität die Verwendung des erhaltenen β-Carotins in der Nahrungsmittelindustrie, obwohl eine Extraktion von β-Carotin kürzlich in US 5 714 658 mittels eines flüssigen or-

ganischen Extraktionsmittels, das einen Essigsäureester von C_1-C_4-Alkoholen umfasste, erreicht wurde.

[0027] Wenn Kristalle von β-Carotin direkt durch Kristallisation des organischen Extrakts aus einer Fermentationsflüssigkeit über eine direkte Verdampfung des Lösungsmittels erhalten werden, weisen die erhaltenen Kristalle im Vergleich zu synthetischem β-Carotin nicht die erforderliche Reinheit auf, und mehrere Stufen einer Umkristallisation und/oder Reinigung mit einem anschließenden Lösungsmittelverbrauch, einer Komplexität des Verfahrens und Produktverlusten sind erforderlich, was zu niedrigen isolierten Ausbeuten führt.

[0028] Kürzlich ist die Herstellung von Kristallen von β-Carotin im Patent PCT WO 98/03480 über ein aufeinander folgendes Waschen mit Wasser oder Alkoholen mit einer niedrigen Molmasse ausgehend von einem Ethylacetat-Extrakt, der durch eine Extraktion der Biomasse aus einer Fermentationsflüssigkeit erhalten wurde, beschrieben worden, wobei, obwohl hoch reine β-Carotin-Kristalle erhalten wurden, ein hoher Verbrauch von Lösungsmitteln wie Ethylacetat und Ethanol, aufeinander folgende Wasch- und Kristallisationsstufen erforderlich sind, wodurch sehr geringe isolierte Ausbeuten des Produkts verursacht werden. In WO98/50574 wird ein Schritt der Entfernung von Lipiden aus einer Biomasse von B. trispora zur Erzeugung von β-Carotin mit einer Reinheit von 93,9 % mittels eines niederen Alkohols offenbart.

Kurzbeschreibung der Erfindung

[0029] Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht in einer Erhöhung der Produktion von β-Carotin in einem Fermentationsverfahren mit Mucor-Pilzen (Blakeslea, Phycomyces etc.), insbesondere Blakeslea trispora, durch die Kultur des Pilzes in einem Fermentationsmedium, das variable Mengen an Lecithin, insbesondere Sojalecithin, enthält, unter Anwendung einer definierten Strategie zur Regelung des pH-Wertes während der Fermentation.

[0030] Auf vergleichbare Weise wird in dieser Erfindung die Herstellung von kristallinem β-Carotin mit hoher Reinheit aus einer Fermentationsflüssigkeit unter Verwendung von als natürlich betrachteten Lösungsmitteln beschrieben. Natürliche Lösungsmittel sind diejenigen, die einerseits toxikologisch unwirksam sind, oder diejenigen, die in Klasse III der ICH-Richtlinien (International Conference of Harmonization) eingeschlossen sind.

[0031] Allgemein betrachtet umfasst das Verfahren die folgenden Stufen:

0) Fermentation in einem Kulturmedium mit Lecithin und unter vorbestimmten Bedingungen einer pH-Regelung
1) Abtrennung der nassen Biomasse von der natürlichen Quelle der Biosynthese (zum Beispiel der Fermentationsflüssigkeit)
2) Reinigung der nassen Biomasse durch eine Behandlung mit Alkohol
3) Abtrennung der gereinigten Biomasse vom Alkohol
4) Konditionierung der gereinigten Biomasse durch deren Trocknen und Zerkleinern oder Zerreißen
5) Fest-Flüssig-Extraktion von β-Carotinoiden mit einem organischen Lösungsmittel
6) Konzentration des angereicherten Extrakts
7) Ausfällung/Kristallisation durch die Zugabe von Alkohol
8) Filtration
9) Trocknung

[0032] Das hier beschriebene Verfahren ermöglicht die Gewinnung von kristallinem β-Carotin mit einer Reinheit von mehr als 90 %, vorzugsweise mehr als 95 % und noch mehr bevorzugt von mehr als 98 %.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0033] Die vorliegende Erfindung beschreibt ein Verfahren zur Erhöhung der Produktion von β-Carotin in einem Fermentationsverfahren mit Mucor-Pilzen (Blakeslea, Choanephora oder Phymomyces, insbesondere Blakeslea trispora. Die Erfindung besteht aus der Kultivierung des Pilzes B. trispora in einem Fermentationsmedium, das Nebenprodukte enthält, die von der Manipulation von Zitrusfrüchten, insbesondere Zitruspulvern, stammen, die mittels eines Verfahrens der Eliminierung von Pektinen durch eine Behandlung mit Calciumhydroxid und anschließende Behandlungen einer pH-Wert-Änderung und eines Waschens zum Konzentrieren bestimmter Komponenten, die die Erzeugung von β-Carotin induzieren, erhalten wurden. Von Zitruspulvern können Pulver, die zum Beispiel von Orangen, Grapefruit, der Mandarine etc. stammen, und bei jeder davon die verschiedenen Sorten, zum Beispiel Navel, Naveline, Clementine, Washington, Valencia-late etc., verwendet werden.

[0034] Einerseits besteht die Erfindung darin, dass das Kulturmedium auch Sojalecithin enthält, und andererseits in der Anwendung einer definierten Strategie zur Regelung des pH-Wertes während der Fermentation. Die vereinigte Wirkung dieser Variablen ermöglicht eine Erhöhung der Erzeugung von β-Carotin und der relativen Konzentration davon mit Hinsicht auf andere als Nebenprodukte anfallende Carotinoide.

[0035] Die zur Fermentation verwendeten Organismen können isolierte (+)- oder (–)-Stämme oder eine Mischung der (+)- und (–)-Stämme von Mucor-Pilzen oder insbesondere von B. trispora oder anderen, β-Carotin superproduzierenden Mutanten von B. trispora, sein. Mehrere Mischungen von (+)- und (–)-Stämmen des Pilzes können beim Fermentationsverfahren der Erfindung verwendet werden.

[0036] Das Fermentationsverfahren kann in jedem Kulturmedium durchgeführt werden, das ein oder mehrere Quellen für Kohlenstoff, eine oder mehrere Quellen für Stickstoff, Mineralsalze, Thiamin und variable Anteile von Zitruspulvern aus einer einzigen Zitrusquelle und eine einzige Sorte oder Mischungen von Pulvern verschiedener Zitrusfrüchte und/oder Sorten und Sojalecithin in variablen Anteilen, die von 0,1 % bis 10 % und vorzugsweise von 0,5 % bis 5 % und noch mehr bevorzugt von 0,5 % bis 1,5 % reichen, enthalten.

[0037] Die Kohlenstoffquellen, die als einzelne oder komplexe Nährstoffe verwendet werden können, umfassen Kohlenhydrate oder Fette wie Dextrine, zum Beispiel Stärken, Glucose, Saccharose, Fruktose, tierische und pflanzliche Öle. Von den Stickstoffquellen können organische und anorganische Quellen, wie zum Beispiel Sojabohnenschalen, Maisstärke, Maismehl, lösliche Destillate, Hefeextrakt, Baumwollmehl, Peptone, Casein oder Ammoniumsulfat verwendet werden. Die Mineralsalze, die zum Kulturmedium gegeben werden können, umfassen Phosphate, Sulfate, Chloride von einwertigen Kationen wie Natrium, Kalium oder Ammonium oder zweiwertigen Kationen wie Calcium oder Magnesium. Die Anteile der Nährstoffe werden als Funktion der Wachstumsanforderungen der Mikroorganismen und der Produktionsgrade bestimmt.

[0038] Die Fermentation wird unter aeroben Bedingungen und in einer submersen Kultur durchgeführt. Die Fermentationstemperatur reicht von 20 °C bis 32 °C, obwohl der Bereich zwischen 25 °C und 28 °C bevorzugt ist.

[0039] Der pH-Wert der Kultur entwickelt sich in den ersten Stunden, in denen ein anfängliches Wachstum des Pilzes im Fermenter erfolgt, frei. Dann wird der pH-Wert mittels der Zugabe von Säure und/oder Alkali innerhalb des Bereichs von 6,5 – 7,2 geregelt, wobei 6,7 – 6,9 bevorzugt ist. Der Beginn der pH-Wert-Regelung hängt von der Entwicklung des Wachstums ab, erfolgt gewöhnlich aber nach einer Fermentation von 12 – 50 h, vorzugsweise zwischen 24 und 36 h.

[0040] Die Einarbeitung von Lecithin in das Medium begünstigt aufgrund der amphipatischen Beschaffenheit dieses Moleküls die Emulgierung von Ölen im Kulturmedium, die in diesem in hohen Konzentrationen gefunden werden, wie dies bei Fermentationsmedien von β-Carotin oft der Fall ist. Diese Maßnahme begünstigt einerseits die Nutzung des Öls durch den Mikroorganismus, und andererseits ist überraschend gefunden worden, dass sie den Carotinogenese-Pfad aktiviert, indem die Transformation von γ-Carotin in β-Carotin begünstigt wird, wodurch die Bildung dieser letzteren Substanz und ihre relative Konzentration mit Bezug auf andere Carotinoide, insbesondere γ-Carotin, verstärkt wird, und führt so zu einer beträchtlichen Verminderung des Vorhandenseins dieser Substanz im Endprodukt, wodurch die Reinheit des Alltrans-β-Carotins erhöht wird.

[0041] Darüber hinaus ist diese Wirkung verstärkt, wenn eine geeignete pH-Wert-Regelung während der Fermentation durchgeführt wird, sodass eine Einstellung des pH-Wertes nach einer Fermentation von 24 – 36 h die Reduktion von γ-Carotin auf eine sogar noch deutlichere Weise begünstigt, wodurch die relative Konzentration der β-Form erhöht wird.

[0042] Das Vorhandensein von γ-Carotin in den Fermentaionsflüssigkeiten von Mucor-Pilzen in Kulturen in der stationären Phase ist bereits beschrieben worden (F. J. Murillo, S. Torres-Martinez, C. M. Aragon und E. Carda-Olmedo (1981) "Substrate transfer in carotene biosynthesis in Phycomyces" Eur. J. Biochem. 119(3): 511 – 516; R. Candau, E. R. Bejarano, E. Carda-Olmedo (1991) "In vivo channelling of substrates in an enzyme aggregate for beta-carotene biosynthesis" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88(11): 4936 – 4940; P. D. Fraser, M. J. Ruiz-Hidalgo, M. A. Lopez-Matas, M. I. Alvarez, A. P. Eslava und P. M Bramley (1996) "Carotenoid biosynthesis in wild type and mutant strains of Mucor circinelloides" Biochim Biophys Acta 1289(2): 203 – 208).

[0043] Dieses Vorhandensein ist auch in Blakeslea trispora (B. J. Mehta und E. Carda-Olmedo (1999) "Lycopene cyclization in Blakeslea trispora" Mycoscience 40(3) 307 – 310) beschrieben worden. In beiden Fällen sind diese hemmenden Wirkungen für einige Substanzen wie Nicotin, 2-(4-Chlorphenylthio)triethylamin, α-Pi-

colin und Imidazol auf die Bildung von β-Catotin beschrieben worden, wobei jedoch die Akkumulation von Lycopin-γ-Carotin aufgrund der Blockierung von Lycopincyclase begünstigt wird. Zuvor sind jedoch keine Verfahren beschrieben worden, die auf die Verminderung des Gehalts an γ-Carotin unter Erhöhung der Erzeugung von β-Carotin und damit der Reinheit des erhaltenen Endprodukts bei der Fermentation von B. trispora abzielen.

[0044] Diese Wirkung der Verminderung des Gehalts von γ-Carotin in den Fermentationsflüssigkeiten von Blakeslea trispora, ein Ergebnis der vorliegenden Erfindung, ist in dem Sinne wichtig, als sie die Einhaltung der Spezifikationen, die sowohl auf dem Niveau der Pharmakopöe als auch für die Nahrungsmittelindustrie für ein Endprodukt aufgestellt wurden, für das eine Reinheit von β-Carotin von wenigstens 96 % im Endprodukt erforderlich ist, ermöglicht.

[0045] Aufgrund des Merkmals, dass die mittels der Fermentation biosynthetisierte Carotinkomponente intrazellulär vorliegt, impliziert das Verfahren zur Isolierung aus der gemäß dem vorliegenden Verfahren hergestellten Kulturflüssigkeit die Trennung der Biomasse von der Flüssigkeit mit dem Ziel, die Verluste in der Flüssigkeit ohne Biomasse zu eliminieren oder zu vermindern.

[0046] Diese Trennung kann mittels der etablierten Verfahren A) der Filtration unter Verwendung der gegenwärtigen Filtertechnologien, entweder mit Streifen, Rotation oder Pressen etc., in denen die durch das Filtermaterial gebildete Barriere die Biomasse abtrennt und ein Passieren der Flüssigkeit ohne die Biomasse ermöglicht, oder B) der Zentrifugation erfolgen, wobei unter Ausnutzung der Dichteunterschiede zwischen der Flüssigkeit und der Biomasse (gewöhnlich höher) eine Vorrichtung wie eine Zentrifuge, eine Dekantiervorrichtung oder Ähnliches verwendet wird, wobei die schwere Phase konzentriert und mit der geringstmöglichen Menge an Biomasse von der flüssigen Phase abgetrennt wird. Eine der Aufgaben dieser Erfindung besteht in einer Verminderung von Verlusten und einer Optimierung der Ausbeute einer jeden jeweiligen Phase, wodurch die größte Menge an Biomasse mit dem höchsten Gehalt an trockenem Rückstand und eine Eliminierung der größten Menge der Fermentationsflüssigkeit erreicht werden.

[0047] Das resultierende nasse Myzel enthält mehr als 95 % der bei der Fermentation erzeugten Carotinoide, vorzugsweise mehr als 97 % und noch mehr bevorzugt mehr als 99 %. Der Carotinoidgehalt der wässrigen Phase beträgt daher weniger als 5 %, vorzugsweise weniger als 3 % und noch mehr bevorzugt weniger als 1 %.

[0048] Dieser nasse Myzelfeststoff würde mittels anschließender Schritte die Abtrennung von β-Carotin ermöglichen, aber der Befund, dass er in Bezug auf die Fermentation einen relativ hohen Prozentwert an einer lipophilen Komponente zwischen 15 und 20 % (Fettsäuren und Öle) beibehält und dass in nachfolgenden Schritten Reinigungsprobleme entstehen, führt aufgrund dieses Problems zur Einführung einer Reinigungsstufe der Biomasse.

[0049] Diese Reinigungsstufe impliziert eine Resuspension der Biomasse mit einer Menge an Alkohol, Methanol, Ethanol, Propanol, Isopropanol oder jedem anderen Alkohol, in dem die Löslichkeit von β-Carotin sehr niedrig ist, oder Mischungen davon, in geeigneten Anteilen, um die maximale Reinigung der Lipidkomponenten zu erreichen, in anderen Worten wird das nasse Myzel mit einer von 1 ml/g bis 10 ml/g nasses Myzel reichenden Alkoholmenge resuspendiert. Die Temperatur der Resuspension reicht von Raumtemperatur bis zum Siedepunkt des Alkohols. Die Kontaktzeit reicht von 5 min bis 24 h. Die so hergestellte Alkohol-Resuspension wird filtriert oder zentrifugiert, sodass der Feststoffgehalt im Filtrat oder Überstand praktisch Null beträgt. Das resultierende nasse Myzel, das Alkohol und Wasser in verschiedenen Anteilen enthält, enthält mehr als 93 %, vorzugsweise mehr als 95 % und noch mehr bevorzugt mehr als 97 % der bei der Fermentation erzeugten Carotinoide.

[0050] In der resultierenden Mischung von Flüssigkeitsrückständen mit Alkohol beträgt der Carotinoidgehalt weniger als 2 %, vorzugsweise weniger als 1 %. Durch diese Behandlung mit Alkohol ist es möglich, eine Reihe von alkohollöslichen lipophilen Substanzen, die als Funktion der Merkmale der verwendeten Flüssigkeit variieren, zu eliminieren, wodurch eine vorherige, extrem wichtige Reinigung erfolgt, die den Erhalt eines kristallinen Endprodukts mit hoher Reinheit ermöglicht. Darüber hinaus erleichtert die Eliminierung eines veränderlichen Anteils von Wasser aus dem anfänglichen, nassen Myzel das Trocknungsverfahren beträchtlich.

[0051] Als Alternative zum Satz dieser beiden Stufen zur Trennung der Biomasse und Reinigung durch Resuspension wird die Möglichkeit einer direkten Vermischung der geernteten Flüssigkeit mit Alkohol in Volumenanteilen von 1:0,5 und 1:5 (Flüssigkeit/Alkohol) und bei Temperaturen zwischen Raumtemperatur und derjeni-

gen des Siedepunkts der Mischung, vorzugsweise zwischen Raumtemperatur und 50 °C, in Betracht gezogen, wobei durch das Halten für eine Mindestkontaktzeit ein Reinigungseffekt erhalten wird, der zu dem beschriebenen äquivalent ist, wodurch das Verfahren durch das Weglassen des Vorgangs der Fest/Flüssig-Trennung vereinfacht wird.

[0052] Die Tatsache, dass das Carotinoidprodukt intrazellulär vorliegt, impliziert, dass für die gereinigte Biomasse eine Konditionierung durch Trocknen und Mahlen, Trocknen und Zerkleinerung oder nur Zerkleinerung der Biomasse erforderlich ist, wodurch ein Vermischen mit Lösungsmitteln begünstigt und eine Extraktion erleichtert werden.

[0053] Das dehydratisierte, gereinigte Myzel wird getrocknet. Das Trocknen kann unter Verwendung normaler Verfahren in festen Chargen oder kontinuierlich erfolgen. Die Trockentemperatur reicht von Raumtemperatur bis 150 °C, sollte vorzugsweise nicht 60 °C übersteigen und sollte noch mehr bevorzugt niedriger als 50 °C sein. Die Trockendauer hängt von der verwendeten Temperatur ab und reicht von 1 h bis 72 h. Aufgrund der möglichen Zersetzung dieser Carotinoide durch Oxidation durch atmosphärischen Sauerstoff ist es üblich, diesen Trocknungsvorgang in Abwesenheit von Sauerstoff entweder in einer Stickstoffatmosphäre oder wenigstens unter Vakuum durchzuführen.

[0054] Um einen guten Zugang des Lösungsmittels zu dem zu extrahierenden Carotinoid zu ermöglichen, muss am Myzel ein vorheriger Zerreißvorgang so durchgeführt werden, dass die spezifische Kontaktoberfläche maximiert wird. Die optimale Teilchengröße für das trockene und zerrissene Myzel sollte weniger als 3 mm, vorzugsweise weniger als 1 mm und noch mehr bevorzugt weniger als 0,5 mm betragen.

[0055] Die Zerkleinerung der Biomasse kann mit herkömmlichen Mitteln am trockenen Produkt erfolgen, zum Beispiel unter Verwendung von mechanischen Mahlvorrichtungen mit rotierenden oder festen Teilen, Stampfer, Siebe etc., durch das Passieren durch rotierende Zylinder, durch Aneinanderpressen oder durch einen Schnelltrocknungstyp in einer Strahlmühlenvorrichtung, bei der das nasse Produkt einem Strom von zirkulierendem Gas bei hoher Temperatur unter Minimierung der Verweilzeit zugeführt wird, um eine Verdampfung des Gehalts an flüssigen Komponenten zu erreichen, und einem aufgrund der Dichteunterschiede des Produkts erfolgenden Transport zu einem Zyklon, wo es isoliert wird.

[0056] Während der Trockenzeit und dem während des Trocknens zurückgelegten Weg erfolgt ein Homogenisierungseffekt, weil die Teilchen mit den Wandungen zusammenstoßen.

[0057] Zur Extraktion von β-Carotin aus dem gemäß der Beschreibung hier konditionierten Myzel können verschiedene organische Lösungsmittel verwendet werden. Diese Erfindung betrifft die Verwendung von Lösungsmittel mit Lebensmittelqualität, die als natürlich betrachtet werden, wie Acylester, vorzugsweise Ethyl-, Propyl-, Isopropyl-, Butyl-, Isobutylester, oder Mischungen davon, die eine vernünftig hohe Löslichkeit für die Carotinoidverbindungen mit ihrer Verträglichkeit als Lösungsmittel vereinigen, wie Lösungsmittel, die in die Gruppe der Klasse III der ICH eingeschlossen sind. Diese Lösungsmittel sind sowohl in Spanien als auch innerhalb der europäischen Gemeinschaft sowohl für pharmazeutische als auch für Lebensmittelanwendungen zulässig (RDL 12/04/96 und RDL 16/10/96).

[0058] Die Extraktionstemperatur variiert zwischen Raumtemperatur und derjenigen des Siedepunkts des Lösungsmittels, vorzugsweise zwischen 50 °C und 80 °C. Die Extraktionszeit stellt das Minimum dar, das zum Erreichen einer Löslichmachung erforderlich ist, und beträgt zwischen 1 s und 1 h, vorzugsweise zwischen 1 min und 15 min. Die Menge des verwendeten Lösungsmittels hängt von der Temperatur und dem Gehalt des Myzels an Carotinoiden ab und reicht zwischen 5 ml/g bis 20 ml/g. Die Anzahl der Extraktionen variiert von 1 bis 3. Die Anzahl der extrahierten Carotinoide ist größer als 85 %, vorzugsweise größer als 90 % und noch mehr bevorzugt größer als 95 %.

[0059] Sobald der an Carotinoiden reiche Extrakt erhalten wurde, muss er zu einem bestimmten Volumen konzentriert werden. Die Endkonzentration an Carotinoiden im Lösungsmittel nach dem Konzentrieren variiert vorzugsweise zwischen 10 und 40 g/l. Die Konzentrationstemperatur sollte weniger als 80 °C, vorzugsweise weniger als 70 °C und noch mehr bevorzugt weniger als 50 °C betragen. Die Konzentrationszeit sollte weniger als 1 h, vorzugsweise weniger als 30 min und noch mehr bevorzugt weniger als 15 min betragen.

[0060] Sobald der Extrakt auf das erforderliche Volumen konzentriert wurde, wird es notwendig, ein Carotinoide unlöslich machendes Mittel, insbesondere einen Alkohol und noch spezieller wasserfreies Methanol, Ethanol, Isopropanol oder jeden anderen Alkohol, in dem die Löslichkeit von β-Carotin gering ist, in Anteilen zwi-

schen 1/1 und 6/1 mit Bezug auf das Lösungsmittelvolumen nach der Konzentration, zuzugeben, wodurch sich die Ausbeute an kristallinem β-Carotin beträchtlich erhöht. Die Zugabe des Alkohols hat auch eine reinigende Wirkung, wodurch ein reineres Produkt isoliert wird, als wenn er nicht zugegeben wird. Die Kristallisationszeit variiert zwischen 15 min und 24 h, vorzugsweise wischen 1 h und 12 h und noch mehr bevorzugt zwischen 3 und 8 h. Die Kristallisationstemperatur sollte weniger als 25 °C, vorzugsweise weniger als 5 °C betragen.

[0061] Die Abtrennung der Kristalle von den Kristallisationswässern kann mittels Filtration oder Zentrifugation erfolgen, wobei die die Kristalle umgebenden Kristallisationswässer, durch denselben Alkohol verdrängt werden, der zu ihrer Unlöslichmachung verwendet wurde.

[0062] Die erhaltenen Kristalle werden unter Vakuum bei Raumtemperatur für wenigstens 1 h getrocknet, bis ein Restgehalt an Lösungsmittel gemäß der durch die Gesetzgebung festgelegten Spezifikationen der Höchstkonzentration erreicht und im Fall von β-Carotin ein Trocknungsverlust von <0,2 % eingehalten wird.

[0063] Die Reinheit der erhaltenen Kristalle an β-Carotin entspricht einem mittels Spektrophotometrie unter Ablesung der Absorption bei 455 nm und Auflösung in Cyclohexan (E1% 1 cm = 2500) gemäß dem spektrophotometrischen Verfahren der U.S.-P, EP, BP bestimmten Titer von mehr als 90 %, vorzugsweise mehr als 95 % und noch mehr bevorzugt von mehr als 98 %, wobei der Gehalt an anderen Carotinoiden weniger als 4 %, vorzugsweise weniger als 2 % beträgt.

[0064] Auf vergleichbare Weise kann das erhaltene kristalline Produkt als solches oder als bildender Bestandteil von Formulierungen, in denen der Anteil von β-Carotin zwischen 1 und 85 % variiert, ein Vermischen mit verschiedenen Trägermitteln oder Verbindungen, wie Sojabohnenöl, Maisöl, Olivenöl etc., mit verschiedenen Reinheitsgraden und vergesellschaftet mit einem Antioxidans des Tocopheroltyps, gehandhabt und vertrieben werden. Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht in der Verfügbarmachung einer Formulierung von in Wasser dispergierbaren Carotinoiden, die etwa 1 bis 25 Gew.-Teile eines trockenen Pulvers von Carotinoiden enthalten, die in einer Stärkematrix mit Lebensmittelqualität dispergiert sind, die β-Carotin im Pulver eingeschlossen in einem stabilen Zustand im Pulver verkapselt verfügbar macht. Es können verschiedene Stärketypen verwendet werden.

[0065] Das Produkt der vorliegenden Erfindung sind feste, in Wasser dispergierbare Formulierungen von β-Carotin.

[0066] Die bevorzugten eingesetzten Stärken sind modifizierte Maisstärken mit Nahrungsmittelqualität mit hoher Molmasse, die eine einfache Emulgierung der organischen Phase in Wasser ermöglichen. Nach der Abtrennung des Lösungsmittels erfüllt die Dispersion den Farbbereich von β-Carotin. Diese modifizierte Nahrungsmittelstärke erzeugt keine ausreichende Wiederdispergierbarkeit des trockenen Pulvers. Somit wird auch eine weitere Stärke zugegeben. Die zweite Varietät ist eine Mischung von Stärken mit Nahrungsmittelqualität mit verschiedenen Molmassen in einem Bereich von 1000 – 700 000, wobei dieser zweite Stärketyp eine gute Dispergierbarkeit des Endprodukts gewährleistet.

[0067] Weil β-Carotin oxidationsempfindlich ist, können Antioxidantien in dem die β-Carotine enthaltenden Lösungsmittel gelöst werden, um die Stabilität gegenüber einer Verschlechterung zu intensivieren. In der vorliegenden Erfindung kann jedes in Nahrungsmitteln zugelassene Antioxidans einschließlich u.a. α-Tocopherol natürlichen oder synthetischen Ursprungs verwendet werden. Die Konzentration des Antioxidans muss zum Schutz der β-Carotine ausreichen und 0,1 bis 0,3 der Menge an β-Carotin betragen. Ascorbylpalmitat kann aufgrund der synergetischen antioxidierenden Wirkung der Assoziation der beiden Antioxidantien ebenfalls zur Formulierung gegeben werden.

[0068] Das Verfahren dieser Erfindung ist insbesondere zur Isolierung von kristallinem β-Carotin aus einer mikrobiellen Quelle, vorzugsweise Algen, Pilzen oder Hefen, noch mehr bevorzugt aus Pilzen der Ordnung Mucor und noch mehr bevorzugt aus B. trispora anwendbar.

[0069] Die extreme Reinheit, die in den mittels der vorliegenden Methodik und unter Verwendung von als natürlich betrachteten Lösungsmitteln erhaltenen Kristallen erreicht wird, bedeutet, dass diese Kristalle in der Lebensmittelindustrie, der pharmazeutischen Industrie oder der Kosmetikindustrie anwendbar sind.

Beispiel 1

[0070] Die Zugabe von Sojalecithin zum Kulturmedium vermindert den Gehalt an γ-Carotin, wenn es in einem

Kolben fermentiert wird.

[0071] Es wird ein Impfmedium hergestellt, dass pro Liter Folgendes enthält: 23 g Sojabohnenschalen, 47 g Maismehl, 0,5 g Monokaliumphosphat, 0,002 g Thiaminhydrochlorid. Sein Anfangs-pH-Wert beträgt 6,3. 67 oder 100 ml des Mediums werden auf 500-ml-Erlenmeyer-Kolben aufgeteilt. Nach der Sterilisierung werden sie mit Suspensionen von Sporen des (+)-Stamms von B. trispora und des (–)-Stamms von B. trispora in getrennten Kolben beimpft und bei 25 °C für 48 h inkubiert.

[0072] Es wird ein Basis-Fermentationsmedium hergestellt, das pro Liter Folgendes enthält: 44 g Sojabohnenschalen, 19 g Maismehl, 10 g Orangenpulver, 0,002 g Thiaminhydrochlorid, 100 g Pflanzenöl. Das Sojalecithin enthaltende Kulturmedium wird gemäß der obigen Beschreibung hergestellt und mit 1 % Lecithin versetzt. Der pH-Wert wird auf 6,3 eingestellt. 20-ml-Portionen des Mediums werden auf 250-ml-Erlenmeyer-Kolben verteilt.

[0073] Zur Fermentation von β-Carotin werden die das Fermentationsmedium enthaltenden Kolben mit 10 % der Mischkultur der Stämme B. trispora (+) und B. trispora (–) inokuliert. Alle Kolben werden bei 25 °C in einem mit 250 U./min betriebenen Rundschüttler inkubiert. Nach einer 48-stündigen Fermentation wird β-Ionon in einem Verhältnis von 1 ml pro Liter Kulturmedium in die Kolben gegeben, und das Myzel wird am 6. Tag der Fermentation isoliert.

[0074] Die Extraktion von β-Carotin wird unter Anwendung eines beliebigen beschriebenen Verfahrens zum Zerreißen von Zellen durchgeführt, das die Freisetzung des intrazellulären Inhalts ermöglicht. Es wird in jedem Lösungsmittel löslich gemacht, in dem es löslich ist, wie zum Beispiel Aceton. Seine Konzentration kann mittels Spektrophotometrie ermittelt werden, wobei die Verwendung von Flüssigchromatographie (HPLC) unter Verwendung eines beliebigen in der Literatur beschriebenen Verfahrens jedoch bevorzugt ist.

[0075] Durch die Zugabe von Sojalecithin wird die Erzeugung von β-Carotin um 5 % verstärkt und die Erzeugung von γ-Carotin um 60 % vermindert (siehe **Fig. 1**). Dieses Experiment zeigt, dass Lecithin eine Erhöhung der Erzeugung von β-Carotin ermöglicht und auch bei der Herstellung eines reineren Produkts hilft.

Beispiel 2.

[0076] Durch die Einarbeitung von Lecithin in das Kulturmedium wird die Erzeugung von β-Carotin erhöht und die relative Konzentration von γ-Carotin in einem Pilotfermenter vermindert. Wenn dies mit der Regelung des pH-Wertes kombiniert wird, ist die Wirkung auf die Erzeugung von γ-Carotin sogar noch größer.

[0077] Es wird ein Impfmedium hergestellt, das pro Liter Folgendes enthält: 23 g Sojabohnenhüllen, 47 g Maismehl, 0,5 g Monokaliumphosphat, 0,002 g Thiaminhydrochlorid. Sein Anfangs-pH-Wert beträgt 6,3. Das Medium wird auf 2000-ml-Erlenmeyerkolben aufgeteilt, wobei sich 500 ml in jedem Kolben befinden. Nach der Sterilisation werden diese mit Suspensionen von Sporen des (+)-Stamms B. trispora und des (–)-Stamms B. trispora in getrennten Kolben beimpft und für 48 h bei 25 °C unter Rundschütteln mit einer Drehzahl von 250 U./min und einer Exzentrizität von 5 cm inkubiert.

[0078] Jeder der Stämme wird unter sterilen Bedingungen in einen Zwischen-Wachstumstank mit einem Kulturmedium mit der folgenden Zusammensetzung pro Liter überführt: 29 g Pharmamedia, 47 g Maismehl, 0,5 g Monokaliumphosphat, 0,002 g Thiaminhydrochlorid, 1 g Schaumverhinderungsmittel. Sein Anfangs-pH-Wert beträgt 6,0.

[0079] Nach einem Inkubieren für 36 – 48 h wird eine Mischung des (+)- und des (–)-Stamms angefertigt, und 10 % der Mischung wird zum Säen des Grundfermentationsmediums verwendet, dessen Zusammensetzung pro Liter wie folgt ist: 50 g Sojabohnenhüllen, 25 g Maismehl, 15 g Orangenpulver, 0,5 g Monokaliumdihydrogenphosphat, 0,28 g Isoniazid, 0,002 g Thiaminhydrochlorid, 80 g pflanzliches Öl, 0,175 g Schaumverhinderungsmittel. Dieses Kulturmedium wird durch 1 % Sojalecithin ergänzt.

[0080] Die Fermentation wird bei einer Temperatur von 25 – 28 °C mit variablem Rühren zwischen 150 und 250 U./min und einer Belüftung von 1 – 1,5 v/v/m verifiziert. Die pH-Wert-Regelung erfolgt mit Ammoniak oder Schwefelsäure, wobei in Abhängigkeit vom Test zwei verschiedene Bedingungen aufrecht erhalten werden: ohne pH-Wert-Regelung mit einem Bereich zwischen 6,5 und 7,5 oder mit einer Regelung bei 6,8 ± 0,1 nach einer Fermentation von 36 h. Zwischen der 40. und der 50. Stunde der Fermentation werden 10 g/l einer 10%igen Lösung von β-Ionon in pflanzlichem Öl zugegeben. Zwischen der 50. und der 60. Stunde werden 10

g/l einer 2,5-%igen Lösung von Ethoxyquin in pflanzlichem Öl zugegeben.

[0081] Die Fermentation wird auf 100 – 140 h ausgedehnt, wonach die Erzeugung von β-Carotin untersucht wird: Die Extraktion von β-Carotin erfolgt durch jedes im Zusammenhang mit dem Zerreißen von Zellen beschriebenen Verfahren, das die Freisetzung des intrazellulären Inhalts ermöglicht. Es wird in einem beliebigen Lösungsmittel, in dem es löslich ist, zum Beispiel Aceton, löslich gemacht. Seine Konzentration kann durch spektrophotometrische Mittel bestimmt werden, wobei die Verwendung von Flüssigchromatographie (HPLC) unter Verwendung eines beliebigen der in der Literatur beschriebenen Verfahren aber bevorzugt ist.

[0082] Die Ergebnisse der mit dem Kulturmedium mit und ohne Lecithin und den beiden oben erwähnten Bedingungen der pH-Wert-Regelung durchgeführten Tests sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

KULTURMEDIUM	pH-WERT	β-CAROTIN %	γ-CAROTIN (% in Bezug auf β-Carotin)
Ohne Lecithin	Bereich 6,5 - 7,5	100	5,6
Ohne Lecithin	Kontrolle 6,8, von der 38. Stunde an	95	3,2
Mit Lecithin	Bereich 6,5 - 7,5	105	4,4
Mit Lecithin	Kontrolle 6,8, von der 38. Stunde an	105	2,1

[0083] Diese Daten zeigen klar, dass die Einarbeitung von Lecithin in das Kulturmedium die Erzeugung von β-Carotin erhöht (5%ige Erhöhung) und die relative Konzentration von γ-Carotin vermindert (um 43 %). Bei einer Kombination mit einer Regelung des pH-Wertes ist die Auswirkung auf die Erzeugung von γ-Carotin sogar noch höher (63 %).

Beispiel 3

[0084] Drei Liter einer Fermentationsflüssigkeit werden geerntet. Der Titer der Flüssigkeit beträgt 6 g β-Carotin pro Liter. Die Biomasse dieser Flüssigkeit wird mittels einer Büchner-Filtration isoliert, wodurch 1000 g nasse Biomasse erhalten werden. Die nasse Biomasse wird in 3 l azeotropem Isopropanol 85/15 resuspendiert und 30 min lang geschüttelt. Die gereinigte Biomasse wird nochmals durch Büchner-Filtration isoliert.

[0085] Diese Biomasse wird in einem Ofen unter Vakuum bei einer Temperatur von weniger als 45 °C für 18 h getrocknet, bis der Gehalt an restlichen Lösungsmitteln im Bereich von 1 – 2 % liegt. Insgesamt 270 g trockene Biomasse werden erhalten und gereinigt, wobei der Gehalt an β-Carotin einer Reinheit von 6,5 % entspricht.

[0086] Die trockene Biomasse wird in einer Hammermühle und mit einem 1-mm-Sieb gemahlen, wodurch ein Feststoff mit derselben spezifischen Reinheit erhalten wird, und konditioniert, um eine Lösungsmittelextraktion zu ermöglichen.

[0087] Die Extraktion erfolgt, indem 270 g der gemahlenen Biomasse mit 4500 ml Isobutylacetat bei 70 °C vermischt werden, wobei das Rühren für 5 min fortgesetzt wird. Die verarmte Biomasse wird vom reichen Lösungsmittel abgetrennt, indem sie durch eine Filterplatte filtriert wird. Die verarmte Biomasse wird mit 500 ml warmem Isobutylacetat über dem Filter selbst gewaschen, und die beiden Lösungsmittel werden vermischt. Die Gesamtmenge an reichem Isobutylacetat wird unter Vakuum konzentriert, wobei die Temperatur auf 45 °C gehalten wird, bis das Volumen auf 700 ml vermindert ist, wobei ein Teil des β-Carotins an diesem Punkt kristallisiert ist. Zur Vervollständigung der Kristallisation und zum Erhalt eines reineren β-Carotins werden 2100 ml Isopropanol zugegeben. Die Mischung wird für 3 h zwischen 0 und 5 °C unter Schütteln gehalten. Sie wird durch einen Büchner-Trichter filtriert, wobei die Kristalle mit 25 ml Isopropanol über dem Büchner-Trichter gewaschen werden. Die Kristalle werden isoliert und getrocknet, wodurch 14 g Kristalle von β-Carotin mit einer Reinheit von 96 %, gemessen mittels Spektrophotometrie, erhalten werden.

Beispiel 4

[0088] Etwa 500 l Fermentationsflüssigkeit mit einem β-Carotin-Titer von etwa 5,5 g/l werden geerntet. Sie wird direkt mit 1500 l 85–15 azeotropem Isopropanol mit Wasser vermischt, und die Mischung wird auf 40 °C erwärmt. Nach einem 30-minütigen Rühren wird die Biomasse mittels Zentrifugation mit einer Dekantiervorrichtung von der Flüssigkeit abgetrennt. Etwa 180 kg gereinigte, nasse Biomasse werden isoliert.

[0089] Diese Biomasse wird in einem Rotationstrockner unter Vakuum getrocknet, bis ein Gehalt an restlichem Lösungsmittel im Bereich von 1 – 2 % erreicht ist. Die Temperatur muss weniger als 45 °C betragen, und die Zeit muss im Bereich von 12 – 24 h liegen. Es werden 45 kg trockene Biomasse mit einem Gehalt an β-Carotin erhalten, der einem spezifischen Gehalt von 5,9 %, einer geringfügig niedrigeren Reinheit, äquivalent ist.

[0090] Die trockene Biomasse wird in einer Hammermühle mit einem 1-mm-Sieb gemahlen, wodurch ein Feststoff mit derselben spezifischen Reinheit erhalten wird, und konditioniert, wodurch die Extraktion mit dem Lösungsmittel ermöglicht wird.

[0091] Als Alternative wird die nasse Biomasse in einem Schnell-Turbotrockner (Strahlmühlentyp) getrocknet, wobei der Mahlschritt in diesem Fall nicht erforderlich ist.

[0092] Die Extraktion wird durchgeführt, indem 45 kg des gemahlenen Feststoffs mit 800 l Isobutylacetat bei 70 °C vermischt werden, wobei das Schütteln für 15 min beibehalten wird. Die verarmte Biomasse wird vom reichen Lösungsmittel durch eine Zentrifugation mit einer Dekantiervorrichtung abgetrennt. Die Gesamtmenge an Isobutylacetat wird unter Vakuum konzentriert, wobei die Temperatur unter 45 °C gehalten wird, bis das Volumen auf 110 l vermindert ist, wobei ein Teil des β-Carotins an diesem Punkt kristallisiert ist. Zur Vervollständigung der Kristallisation von β-Carotin werden 330 l Isopropanol zugegeben. Die Mischung wird bei 0 – 5 °C für 3 h weiter geschüttelt, während sie abkühlt. Sie wird durch einen Büchner-Trichter filtriert, wobei die Kristalle von β-Carotin isoliert werden, und diese werden getrocknet. 2,1 kg Produkt mit einer Reinheit von 96 %, gemessen mittels Spektrophotometrie, werden erhalten.

Beschreibung von Figur 1

A: Prozentuale Produktion von β-Carotin mit Lecithin (rechte Spalte) oder ohne Lecithin (linke Spalte).
B: Prozentuale Produktion von γ-Carotin mit Lecithin (rechte Spalte) oder ohne Lecithin (linke Spalte).

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Carotinoiden, umfassend die Stufen der:
(1) Fermentation einer Biomasse auf der Grundlage von Mucor-Pilzen als submerse Kultur,
(2) Trennung der Biomasse,
(3) Reinigung der Biomasse durch Entfernung von lipophilen, von Carotinoiden verschiedenen Komponenten mittels einer Extraktion mit Alkohol,
(4) Trocknung der Biomasse und deren Zerkleinerung,
(5) Fest/Flüssig-Extraktion der in der Biomasse enthaltenen Carotinoide mit nahrungsmittelgeeigneten organischen Lösungsmitteln,
(6) Konzentration eines an Carotinoiden reichen Extrakts,
(7) Ausfällung-Kristallisation des Carotinoids durch die Zugabe von Alkohol,
(8) Filtration und des endgültigen Trocknens, gekennzeichnet durch die Zugabe von Lecithin in Stufe (1) zum Kulturmedium nach dem Beginn der Fermentation unter Regelung des pH-Wertes, wobei die Regelung des pH-Wertes aus Folgendem besteht:
(a) Einstellung des pH-Wertes innerhalb des Bereichs von 6,5 – 7,2,
(b) Einstellung des pH-Wertes nach 24 – 36 h der Fermentation.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die submerse Kultur unter aeroben Bedingungen durchgeführt wird, der Mucor-Pilz zur Gattung Blakeslea, insbesondere B. trispora gehört und es sich beim erhaltenen Carotinoid um β-Carotin handelt.

3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass Soja-Lecithin mit einem Prozentwert von 0,1 – 10, vorzugsweise 0,5 – 5 % und noch mehr 0,5 – 1,5 % zugegeben wird.

4. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass der (+)- und/oder der (–)-Stamm oder an-

ders ausgewählte, β-Carotin superproduzierende Mutanten von β-trispora kultiviert werden.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 – 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Temperatur während der Fermentation von 20 bis 32 °C reicht.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass Schritt (3) der Reinigung der Biomasse zur Entfernung von lipophilen, von Carotinoiden verschiedenen Komponenten aus der Suspension der Biomasse in einem Alkohol, in dem die Löslichkeit der Carotinoide niedrig ist, vorzugsweise in Methanol, Ethanol, Propanol oder Isopropanol, besteht.

7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Reinigung der Biomasse (3) im Kulturmedium selbst direkt nach Schritt (1) oder alternativ nach der Trennung vom Medium nach Schritt (2) erfolgt.

8. Verfahren nach Anspruch 1, 6 und 7, dadurch gekennzeichnet, dass die zuzugebende Alkoholmenge zwischen 1 ml/g und 10 ml/g nasses Myzelium beträgt, die Temperatur während der Suspension von Raumtemperatur bis zum Siedepunkt des zugegebenen Alkohols reicht, wobei die Kontaktzeit 5 min bis 24 h beträgt.

9. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass, wenn die Reinigung der Biomasse direkt an der Kulturflüssigkeit erfolgt, die Flüssigkeit:Alkohol-Verhältnisse von 1:0,5 bis 1:5 reichen.

10. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Trocknungs-Zerkleinerungs-Stufe (4) der Biomasse chargenweise oder als kontinuierliches Verfahren in Abwesenheit von Sauerstoff bei einer Temperatur, die von Raumtemperatur bis 150 °C reicht, und für einen Zeitraum, der von 1 h bis 72 h reicht, erfolgen kann.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Zerkleinerung der Biomasse mittels herkömmlicher Mittel erfolgt, bis eine Teilchengröße von weniger als 3 mm erreicht ist.

12. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der zur Reinigung der Biomasse verwendete Alkohol aus Methanol, Ethanol, Propanol oder Isopropanol oder Mischungen davon ausgewählt ist.

13. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Extraktionsstufe (5) 1 bis 3 Mal wiederholt wird und aus dem Waschen der trockenen und zerkleinerten Biomasse mit nahrungsmittelgeeigneten organischen Lösungsmitteln bei einer Temperatur, die zwischen der Raumtemperatur und dem Siedepunkt des Lösungsmittels liegt, für einen Zeitraum, der von 1 s bis 1 h reicht, in einer Menge, die von 5 ml/g bis 20 ml/g reicht, dem Erhalt eines an Carotinoiden reichen Extrakts mit einem Gehalt an diesen Substanzen von mehr als 85 %, vorzugsweise mehr als 90 % und noch mehr bevorzugt mehr als 95 %, besteht.

14. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das in der Extraktionsstufe (5) verwendete Lösungsmittel aus einem Acylester, vorzugsweise einem Ethyl-, Propyl-, Isopropyl-, Butyl- oder Isobutylacetat oder Mischungen davon besteht.

15. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der an Carotinoiden reiche Extrakt einer Konzentrationsstufe (6) mit herkömmlichen Mitteln bei einer Temperatur von weniger als 80 °C für einen Zeitraum von weniger als 1 h unterzogen wird, bis eine Carotinoid-Konzentration im Bereich zwischen 10 und 40 g/l erreicht ist.

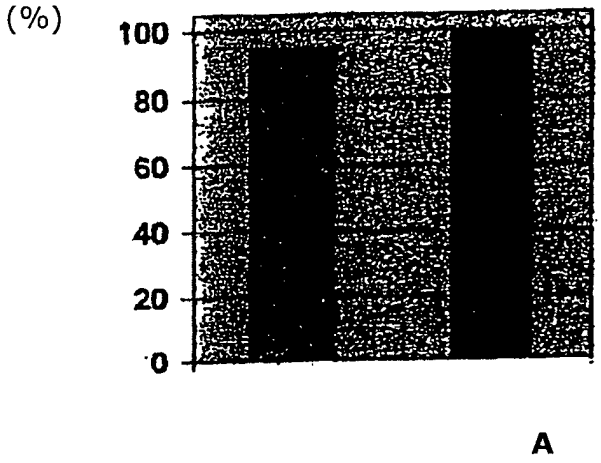
16. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der an Carotinoiden angereicherte Extrakt einer Stufe (7) einer Ausfällung-Kristallisation durch die Zugabe eines Alkohols im Anteil 1/1 bis 6/1 in Bezug auf das Volumen des Lösungsmittels nach der Konzentration (6) bei einer Kristallisationstemperatur von weniger als 25 °C und für eine von 15 min bis 24 h reichende Kristallisationszeit unterzogen wird.

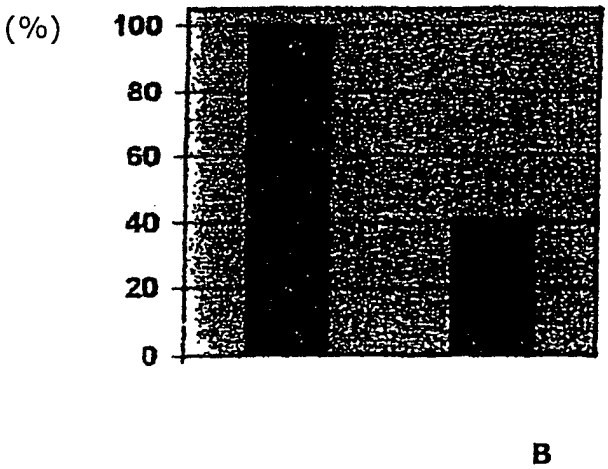
17. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Regelung des pH-Werts zwischen 12 und 50 h nach Beginn der Fermentation durchgeführt wird.

18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass der pH-Wert zwischen 24 und 36 h nach Beginn der Fermentation geregelt und auf einen Bereich von 6,7 – 6,9 eingestellt wird.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen





FIGUR 1