



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 292 341**

② Número de solicitud: 200600777

⑤ Int. Cl.:
C11C 1/00 (2006.01)

C12S 3/18 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **13.03.2006**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.03.2008**

Fecha de la concesión: **18.02.2009**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **16.03.2009**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.03.2009

⑰ Titular/es: **Universidad de Almería
Ctra. de Sacramento, s/n
04120 La Cañada de San Urbano, Almería, ES**

⑱ Inventor/es: **Ramírez Fajardo, Antonio;
Esteban Cerdán, Luis y
Robles Medina, Alfonso**

⑲ Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

⑳ Título: **Procedimiento para la purificación de ácido eicosapentaenoico (EPA).**

㉑ Resumen:

Procedimiento para la purificación de ácido eicosapentaenoico (EPA).

La presente invención se refiere a un procedimiento para la purificación de EPA mediante reacciones enzimáticas de esterificación, caracterizadas por lipasas, a partir de extractos de pescado y microalgas y al uso del factor adimensional de eficacia para la cuantificación de la eficacia de las lipasas para concentrar y recuperar de forma simultánea un ácido graso poliinsaturado en la fracción de ácidos grasos libres.

ES 2 292 341 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la purificación de ácido eicosapentaenoico (EPA).

5 Sector de la técnica

La invención se encuadra en el sector técnico de procesos de purificación de ácidos grasos en condiciones suaves, más concretamente mediante reacciones enzimáticas.

10 Estado de la técnica

Los PUFAs se dividen en familias según la posición del primer doble enlace dentro de la cadena carbonada contando a partir del metilo terminal. Las tres familias más importantes tienen ese primer doble enlace en las posiciones 3, 6 ó 9, dando lugar a las llamadas series n-3, n-6 y n-9 (o ω 3, ω 6 y ω 9), respectivamente.

15 El grupo de ácidos grasos n-3 (o ω -3) está constituido por los ácidos docosahexaenoico (DHA, 22:6n3), eicosapentaenoico (EPA, 20:5n3), estearidónico (SA, 18:4n3) y (α -linolénico (ALA, 18:3n3). Todos son de origen marino, excepto el ácido α -linolénico, que se encuentra en los aceites de vegetales superiores (Herold, P. M. y Kinsella, J. E. (1986). Fish oil consumption and decreased risk of cardiovascular disease: a comparison of findings from animal and human feeding trials. *Am. J. Clin. Nutr.*, 43: 566-598).

20 Desde hace tres décadas se conocen muchos de los beneficios en el cuidado de la salud que supone incluir PUFAs en la dieta, (18-21). Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS) n-3, como el ácido eicosapentaenoico (EPA), han suscitado gran atención debido al importante papel que juegan en la salud humana. EPA ha sido usado para la prevención y el tratamiento enfermedades circulatorias (Simopoulos, A. P. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am. J. Clin. Nutr.* 54: 438-463 (1991)) e inflamatorias (Ziboh, V. A. ω 3 polyunsaturated fatty acid constituents of fish oil and the management of skin inflammatory and scaly disorders. In Simopoulos AP, Kifer RR, Martin RE, Barlow SM (eds), Health Effects of ω 3 Polyunsaturated Fatty Acid in Seafoods. *Word Rev. Nutr. Diet.* 66: 425-435 (1991)), el etil éster EPA ha sido usado para el tratamiento de arterosclerosis e hiperlipidemia desde 1991 en Japón (Shimada, Y. Application of lipase reactions to separation and purification of useful materials. *Inform Biotechnology* 12:1168-1174 (2001)). Las aplicaciones farmacéuticas y clínicas requieren altas concentraciones de PUFAs (Carsten, M., Molina Grima, E., Robles Medina, A., Giménez Giménez, A. and Ibáñez González, M.J.. Eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n3) from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73: 1025-1031 (1996)).

35 Como se observa en la tabla 1, las fuentes más usuales de obtención de PUFAs n-3 son aceites vegetales y aceites de pescado, (Nettleton, J. A. (1991). Omega-3 fatty acids: comparison of plant and seafood sources in human nutrition. *Journal of the American Dietetic Association*, 91 (3): 331-337), y las algas marinas. El EPA y el DHA se encuentran principalmente en aceites de pescado: la caballa, el arenque y el salmón son especialmente ricos en PUFAs n-3, (Rose, D. P. y Connolly, J. M. (1999). Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. *Pharmacology & Therapeutics*, 83 (3): 217-244). Algunas algas también contienen cantidades importantes de estos ácidos.

45 Actualmente, la concentración de PUFAs a partir de extractos de ácidos grasos libres (AGLs) se lleva a cabo en los laboratorios por distintos procedimientos, como por ejemplo el método de los compuestos de inclusión de urea y la cromatografía líquida. Sin embargo, este método no preserva al máximo la estabilidad de los PUFAS.

50 Anteriormente nuestro grupo de investigación desarrolló un método de tres pasos para obtener un PUFA altamente puro a partir de extractos de ácidos grasos libres (AGLs), dicho método suponía el aislamiento del PUFA mediante cromatografía líquida (Robles Medina, A., Giménez Giménez, A., García Camacho, F., Sánchez Pérez, J.A., Molina Grima, E., y Contreras Gómez, A. Concentration and purification of stearidonic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids from cod liver oil and the marine microalga *Isochrysis galbana*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 72: 575-583 (1995); Ibáñez González, M.J., Robles Medina, A., Molina Grima, E., Giménez Giménez, A., Carstens, M., and Esteban Cerdán, L. Optimization of fatty acid extraction from *Phaeodactylum tricornutum* UTEX 640 biomass. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75: 1735-1740 (1998)), sin embargo, la implantación industrial de este método es complicada debido al alto coste del paso de la cromatografía.

65 Las lipasas son conocidas por tener una pequeña actividad sobre los PUFAs (Yang, L. Y., Kuksis, A. and Myher, J. J. Lipolysis of menhaden oil triacylglycerols and the corresponding fatty acid alkyl esters by pancreatic lipase *in vitro*: a reexamination. *J. Lipid Res.* 31: 137-148 (1990); Shimada, Y., Sugihara, A., Maruyama, T., Nagao, T., Nakayama, H., Nakano, H., and Tominaga, Y. Enrichment of arachidonic acid: selective hydrolysis of a single-cell oil from *Mortierella* with *Candida cylindracea* lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 72: 1323-1327 (1995)), algunos autores, enriquecen los ácidos grasos (AG) mediante hidrólisis selectiva (Shimada, Y., Maruyama, K., Nakamura, M., Nakayama, S., Sugihara, A. y Tominaga, S. Selective hydrolysis of polyunsaturated fatty acid-containing oil with *Geotrichum candidum* lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 72: 1577-1581 (1995)), esterificación selectiva (Hills, M. J., Kiewitt, I. y Mukherjee, K. D. Enzymatic fractionation of fatty acids: enrichment of γ -linolenic acid and docosahexaenoic acid by selective esterification catalyzed by lipases. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 67: 561-564 (1990)) y alcoholisis selectiva (Shimada, Y., Sugihara, A., Yodono, S., Nagao T., Maruyama, K., Nakano, H., Komemushi, S. and Tominaga, Y. Enrichment of ethyl docosahexaenoate by selective alcoholysis with immobilized *Rhizopus delemar* lipase. *J. Ferment. Bioeng.* 84: 138-

143 (1997); Shimada, Y., Maruyama, K., Sugihara, A., Baba, T., Komemushi, S., Moriyama, S. and Tominaga, Y. Purification of ethyl docosahexaenoate by selective alcoholysis of fatty acid ethyl esters with immobilized *Rhizomucor miehei* lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75: 1565-1571 (1998)).

5 Diferentes autores han descrito que algunas enzimas muestran acil-selectividad en la esterificación de ácidos grasos con alcoholes. La esterificación preferente de ácidos grasos ha permitido un enriquecimiento de algunos PUFAs, como el ácido γ -linolénico (GLA) o el ácido docosohexaenoico (DHA), en la fracción de ácidos grasos sin esterificar. Algunos autores concentraron ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido γ -linoleico mediante reacciones enzimáticas y estos AG son producidos industrialmente mediante hidrólisis selectiva (Shimada, Y. Application of lipase reactions to separation and purification of useful materials. *Inform Biotechnology* 12:1168-1174 (2001)). Sin embargo la concentración de EPA es muy dificultosa. En este sentido (Miller, C., Austin, H., Posorske, L. y González, J. Characteristics of an immobilized lipase for the commercial synthesis of esters. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65: 927-931 (1988)) muestra que la actividad de la lipozima RMIM de *Rhizomucor miehei*, sobre un AG disminuye en proporción a la cercanía de un doble enlace del AG con el grupo carboxilo. Este factor explica porque el DHA (22:6n3) es concentrado más fácilmente que el EPA (20:5n3), ya que el EPA tiene un doble enlace en el átomo de carbono número 5 y DHA en el número 4, contando a partir del grupo carboxilo terminal.

20 Wanasundara and Shahidi (Wanasundara, U.N. and Shahidi, F. Lipase-assisted concentration of n-3 polyunsaturated fatty acids in acylglycerols from marine oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75: 945-951 (1998)) concentraron DHA y EPA por hidrólisis de grasa de foca y aceites menhaden usando lipasas. El incremento de la concentración de DHA del aceite de grasa de foca de 7.6% a 24% (una relación de 3.2) y la concentración de EPA de 6.4% a 9.8% (una relación de sólo 1.5); estos resultados fueron obtenidos después de 35 horas de hidrólisis, pero a las 80 h el contenido en EPA disminuyó a 8.5%.

25 Recientemente, se está prestando atención a las larvas de pescado como fuente alternativa de PUFAs (Sargent, J.; McEvoy, L.; Estevez, A.; Bell, G.; Bell, M.; Henderson, J. y Tocher, D. (1999a). Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture*, 179 (1-4), 217-229; Sargent, J. R. y Tacon, A. G. (1999b). Development of farmed fish: a nutritionally necessary alternative to meat. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 58 (2): 377-383). La composición y contenido de PUFAs n-3 en los aceites de pescado varía ampliamente con la especie, tamaño, sexo y alimentación de los pescados, así como con la zona de pesca y época del año. Los costes de producción de estos extractos de pescado son bajos y poseen un alto contenido de vitaminas liposolubles, como las vitamina A y E (esta última tiene además efecto antioxidante) pero los concentrados de PUFAs procedentes de aceites de pescado presentan algunos problemas, como son su olor desagradable, la presencia de ciertos compuestos químicos (metales pesados en forma alquílica y de partículas) presentes en el medio marino, (Plakas, S. M. y Guarino, A. M. (1986). Omega-3 fatty acids and fish oils: Is the news all good? *Proceedings of eleventh Annual Tropical and Subtropical Fisheries Conference of the Americas. Texas Agricultural Extension Service. Marine Service Program*), y un elevado contenido en colesterol (Cohen, Z. y Cohen, S. (1991). Preparation of eicosapentaenoic acid (EPA) concentrate from *Porphyridium cruentum*. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 68: 16-19; Bajpai, P. y Bajpai, P.K. (1993). Eicosapentaenoic acid (EPA) production from microorganisms: a review. *J. Biotechnol.*, 30: 161-183). Por otra parte, su producción puede fluctuar con la pesca y, además, la composición de estos aceites es bastante compleja, (a menudo contienen de 40 a 50 ácidos grasos diferentes). Akoh y Hearnberger (Akoh, C. C. y Hearnberger, J. O. (1991). Effect of catfish and salmon diet on platelet phospholipid and blood clotting in healthy men. *J. Nutr. Biochem.*, 2: 329-333) advierten que el efecto beneficioso de la incorporación en la dieta de PUFAs n-3 procedentes de pescados marinos puede ser contrarrestado por el alto contenido en sodio de algunos pescados; el contenido de sodio en la dieta es uno de los factores más importantes que contribuyen a los desórdenes en la circulación sanguínea e hipertensión.

50 Existe la necesidad de encontrar un procedimiento de purificación de EPA que sea rápido, poco contaminante, con bajo contenido en compuestos químicos y por tanto más saludables y de bajo coste económico que satisfaga las necesidades de la industria farmacéutica y agroalimentaria.

Breve descripción de la invención

55 La presente invención se refiere a un procedimiento para la purificación de EPA mediante reacciones enzimáticas de esterificación, catalizadas por lipasas, a partir de extractos de pescado y microalgas, por lo que la presente invención proporciona un procedimiento de purificación alternativo a los procesos industriales que existen, resolviendo los problemas expuestos en el estado de la técnica.

60 Un aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la purificación de ácido eicosapentaenoico donde dicha purificación se realiza mediante la concentración del ácido eicosapentaenoico en la fracción de ácidos grasos libres mediante la esterificación de un extracto lipídico catalizada por lipasas.

En una realización particular de la invención las lipasas son seleccionadas mediante la determinación del factor adimensional de eficacia.

65 En otra realización particular de la invención, el proceso de purificación de ácido eicosapentaenoico se realiza opcionalmente con un disolvente, preferentemente el disolvente es n-hexano.

En otra realización particular de la invención, el extracto lipídico es un extracto de microalgas.

ES 2 292 341 B1

En otra realización particular de la invención, el extracto lipídico es un extracto de pescado.

Un aspecto de la presente invención se refiere al uso del factor adimensional de eficacia para la cuantificación de la eficacia de los catalizadores para concentrar y recuperar de forma simultánea un producto en una fracción.

En una realización particular de la invención, el producto es un ácido graso poliinsaturado.

En una realización particular de la invención, la fracción es la fracción de ácidos grasos libres.

En una realización particular de la invención, los catalizadores son enzimas.

En una realización particular la invención se refiere al uso del factor adimensional de eficacia para la cuantificación de la eficacia de las lipasas para concentrar y recuperar de forma simultánea un ácido graso poliinsaturado en la fracción de ácidos grasos libres.

Cuando en la presente invención hablamos de factor adimensional de eficacia, nos referimos al producto de los factores adimensionales de concentración y de recuperación, sin embargo, este factor adimensional de eficacia puede ser utilizado para la comparación de la adecuación de dos procedimientos basados en el mismo fundamento, es decir, este factor adimensional de eficacia se puede aplicar a cualquier procedimiento de purificación en el que la purificación esté basada en la selectividad del elemento responsable de la purificación, así será para todo caso en el que un determinado producto está compuesto de diferentes sustancias de las cuales queremos purificar una sustancia determinada y esta purificación se realiza discriminando o favoreciendo de que la sustancia a purificar pase a una determinada fracción con respecto a un total o a otra sustancia que quedaría en otra fracción. De esta manera conforme avance el proceso purificador, el producto a purificar irá pasando a una fracción determinada a una velocidad mayor o menor que el resto de productos.

Descripción de las figuras

La Figura 1 se refiere a la influencia del grado de esterificación en el factor de eficacia.

La Figura 2 se refiere a la influencia de la relación molar AGLs/alcohol láurico en el Grado de Esterificación (GE) a diferentes temperaturas

La Figura 3 se muestra la relación del GE con la intensidad de tratamiento por unidad de masa de sustrato

La Figura 4 y la Figura 5 muestran la influencia del GE en el Factor de concentración (F_C) y el Factor de recuperación (F_R) de EPA en la fracción de AGLs sin esterificar y en el grado de recuperación.

La Figura 6 muestra la variación del Factor adimensional de eficacia (F_{AE}) con el GE.

Descripción detallada de un modo de realización

Se concentró EPA en una fracción de AGLs mediante esterificación de una mezcla de AGLs que contenía EPA.

Como fuente de AGLs se utilizaron:

- extracto de aceite comercial EPAX4510TG (Pronota Biocare, Norway) que contenía un 43.1% de EPA (tabla 2).
- mezcla de AGL rica en EPA, preparada a partir de células húmedas o un liofilizado de microalgas marinas *Phaeodactylum tricornutum* (UTEX 640), para ello las células fueron crecidas en un fotobio-reactor tubular, cultivadas por centrifugación a 1800 xg, y guardadas a -8°C hasta su uso. La mezcla de células de *P. tricornutum* fueron obtenidas en tres pasos:
 - a) saponificación directa de las células de las microalgas
 - b) extracción de insaponificables
 - c) extracción de AGLs

Las lipasas usadas, se muestran en la tabla 3: Lipasa D de *Rhizopus oryzae*, M de *Mucor javanicus*, AK de *Pseudomonas fluorescens* (Amano Pharmaceutical Co., Japan), Lipozima RMIM de *Rhizomucor miehei*, Novozime 435 de *Candida antarctica* (Novo Nordisk, A/S, Bagsvaerd, Denmark), EU-093 de *Rhizopus oryzae*, EU-034 de *Pseudomonas stutzeri*, (Europe Bioproducts, Cambridge, UK), QLMex de *Alcaligines* sp., y OFex de *Candida rugosa* (Meito Sangyo, Japan). Las lipasas D, M, AK, EU-093, EU-034, QLMex, y OFex fueron proporcionadas como polvo y con un contenido mínimo en agua de 10%. En algunos experimentos las lipasas fueron inmovilizadas en Celite 545 AW (Fluka Chemie). Esta inmovilización fue llevada a cabo en nuestro laboratorio según Soumanou *et al.* (Herold, P. M. y Kinsella, J. E. (1986). Fish oil consumption and decreased risk of cardiovascular disease: a comparison of findings

ES 2 292 341 B1

from animal and human feeding trials. *Am. J. Clin. Nutr.*, 43: 566-598). La relación de Celite/lipasa fue 2.5:1 y 4:1 (w/w).

La esterificación de los AGLs se llevó a cabo utilizando alcohol láurico (1-dodecanol; Panreac, Barcelona, Spain).

La mezcla final resultante de la reacción de esterificación contenía AGLs, ésteres láuricos (EL), alcohol láurico, hexano, y una pequeña cantidad de agua.

Con el fin de determinar si las lipasas empleadas poseían alguna especificidad hacia el EPA o el DHA, se determinó el factor de concentración y el factor de recuperación.

El factor de concentración (F_C) de cada ácido graso se expresó como la relación entre la concentración de EPA o DHA en los AGLs que quedan sin esterificar y la concentración de EPA o DHA en el extracto de AGLs inicial. Este valor se ha calculado como la media aritmética entre el factor de concentración F_{CI} , obtenido directamente a partir del análisis (por cromatografía en capa fina (TLC) seguida de cromatografía en gas (GC)) de la fracción de AGLs y el factor de concentración F'_{CI} , obtenido mediante el balance de materia realizado a partir del análisis (por TLC seguida de GC) de la fracción de ésteres láuricos formados. Se hizo la media de los dos y se obtuvo un dato procedente de dos análisis independientes (disminución del error analítico) y compensamos los efectos de la posible mayor oxidación de los PUFAs en los AGLs que en los ésteres.

Por un lado, F_{CI} se calculó con la fórmula

$$F_{CI} = \frac{C_{EA}}{C_{EA0}}$$

donde C_{EA} fue la concentración de cada PUFA (EPA o DHA) en la fracción de los AGLs sin esterificar (porcentaje en peso sobre el AGs totales, obtenido por TLC seguida de GC) y C_{EA0} fue la concentración de cada PUFA en el extracto de AGLs inicial (porcentaje en peso sobre el AGs totales, obtenido por GC directa).

Por otro lado, del resultado del balance, F'_{CI} se calculó con la siguiente fórmula:

$$F'_{CI} = \frac{100 - \frac{C_{EL} X_L}{C_{EA0}}}{X_A}$$

donde X_A fue la fracción másica de estos AGLs sin esterificar, C_{EL} fue el contenido en cada PUFA en los ésteres láuricos (ELs) formados y X_L es la fracción en peso de estos ELs.

El factor de recuperación (F_R) se definió como el porcentaje del ácido graso de interés (EPA o DHA) recuperado en la fracción de AGLs sin esterificar con respecto al contenido del mismo en la mezcla final de AGLs y ELs. Se calculó a partir de la ecuación

$$F_R = \frac{C_{EA} X_A}{C_{EA} X_A + C_{EL} X_L} 100$$

En experimentos anteriores se observó que ninguna de las lipasas ensayadas era totalmente selectiva hacia el EPA y además esta selectividad parcial se manifestaba “discriminando” al EPA en mayor o menor grado cuando era esterificado por el alcohol, es decir, la selectividad hacia el EPA era tanto mayor cuanto menor era la velocidad de esterificación del EPA con respecto a la velocidad de esterificación de los demás ácidos grasos.

La selectividad de una lipasa no tiene porque depender directamente de factores como la temperatura, la adición de agua, la cantidad de lipasa o el procedimiento de inmovilización. Estos factores afectarán más bien a la actividad de la lipasa. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que la selectividad de la lipasa sí dependía de la composición de la mezcla de ácidos grasos en cada momento de la reacción. Para una lipasa con cierta “selectividad” hacia el EPA, a medida que aumentaba el grado de esterificación mayor era la concentración de EPA libre, por lo que mayor fue la velocidad de esterificación de este ácido y menor el efecto de su “selectividad” con respecto a él. Por lo tanto, para

ES 2 292 341 B1

comparar la selectividad de varias lipasas no bastó con hacer ensayos en unas condiciones experimentales concretas con cada lipasa, sino que hicimos experimentos en los que se observó la variación de los factores de concentración y recuperación del EPA con el grado de esterificación.

5 Así pues, planificamos una serie de experimentos en el mismo rango de condiciones experimentales con cada una de las tres lipasas seleccionadas. Con diferentes cantidades de lipasa se consiguió obtener diferentes Grados de Esterificación (de los que dependía la “selectividad”). También se buscó la temperatura de trabajo más adecuada y el efecto de la presencia y la ausencia de agua al inicio de la reacción. Las lipasas habían sido suministradas sin inmovilizar por lo que se consideró interesante estudiar la posibilidad de inmovilizarlas de manera que pudiera incrementarse su
10 estabilidad y su facilidad de recuperación. Se ensayaron variaciones del método de inmovilización para encontrar la relación lipasa/soporte más adecuada.

El grado de esterificación (GE) se calculó como la media aritmética de los porcentajes de ésteres formados medidos por CCF y volumetría ácido-base.

15 Como se ha comentado anteriormente, una lipasa tendrá un comportamiento más selectivo en unas condiciones determinadas cuanto más concentre con una mayor recuperación del producto en la fracción deseada. Una forma de que la concentración y la recuperación se consideren en igual medida es adimensionar sus valores de manera que queden comprendidos entre 0 (mínimo) y 1 (máximo).

20 En este sentido, para cuantificar la concentración del EPA también se empleó el factor adimensional de concentración del EPA (F_{AC}), que se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$25 \quad F_{AC} = \frac{C_{EA} - C_{EA0}}{100 - C_{EA0}}$$

30 donde C_{EA} fue el porcentaje de EPA en la fracción de AGLs sin esterificar y C_{EA0} fue el porcentaje de EPA en el extracto de ácidos grasos inicial. Los valores de F_{AC} estaban comprendidos entre 0 y 1, ya que, cuando el EPA no se concentra en absoluto puesto que es esterificado a igual velocidad que los demás ácidos grasos, $C_{EA}=C_{EA0}$ y $F_{AC}=0$; por otra parte, en un caso hipotético en el que el EPA no se esterificara en absoluto y todos los demás ácidos grasos
35 quedarán totalmente esterificados $C_{EA}=100$ y $F_{AC}=1$. La introducción de F_{AC} tenía como único objetivo proporcionar un parámetro que midiera el grado de concentración del EPA en la fracción de ácidos grasos y variase entre 0 y 1, igual que el factor de recuperación, F_R . De esta manera F_{AC} y F_R unificamos en un sólo factor que sirvió para comparar los resultados obtenidos con las distintas lipasas y ayudando a elegir la mejor.

40 Así, para tener en cuenta ambos factores (concentración y recuperación del EPA), se definió el factor adimensional de eficacia (F_{AE}) como el producto de los factores adimensionales de concentración y de recuperación, es decir:

$$45 \quad F_{AE} = F_{AC} \cdot F_R = \frac{C_{EA} - C_{EA0}}{100 - C_{EA0}} F_R$$

50 Este parámetro se empleó para cuantificar simultáneamente la eficacia de las lipasas para concentrar y para recuperar el EPA en la fracción de AGLs y por tanto la selectividad presentada para unas condiciones determinadas.

Los efectos de las variables elegidas sobre los grados de esterificación hicieron que la selectividad de la lipasa cambiase. Así, el aumento del grado de esterificación se tradujo en una menor velocidad del aumento de los factores de concentración y una mayor velocidad en la disminución de los rendimientos de recuperación (y por lo tanto menor
55 velocidad de aumento del F_{AE} que llegó a anularse para empezar a disminuir).

La selectividad fue la pendiente del F_{AE} que fue máxima al comienzo de la reacción y la reacción avanzó mientras la selectividad fue positiva (en el F_{AE} máximo). De esta forma, se obtuvieron diferentes grados de esterificación, determinándose la evolución del F_{AE} y, por tanto, de su selectividad.

60 Para obtener la mezcla de AGLs en la cual se concentró el EPA, las fracciones de AGLs y ésteres láuricos (EL) fueron separadas por adición de una solución KOH para neutralizar los AGLs. El EL fue extraído con n-hexano, y los AGLs (en forma de sal potásica) fueron recuperados en la fase acuosa. Esta fase acuosa fue entonces acidificada con una solución de HCL y los AGLs fueron extraídos con n-hexano.

65 Los presentes ejemplos pretenden ser ilustrativos de la invención y nunca limitativos.

ES 2 292 341 B1

Ejemplo 1

Esterificación de AGLs con alcohol láurico

5 Partimos de 170-1780 mg de AGLs, 222-4440 mg de alcohol láurico con una relación molar AGLs/alcohol láurico de 1:1-1:4, 0-25 ml/g-sustrato de n-hexano y 1.25-200 mg de lipasa/g-sustrato. Todos los reactivos fueron introducidos en un erlenmeyer y se incubaron a una temperatura variable (30, 40 o 55°C) y a 400 r.p.m. (incubador Shaking SWB 20, Haake Mess-Tecnik GmbH u. Co., Germany) durante diferentes tiempos. La reacción fue parada por adición de 6-8 ml de hexano y la mezcla fue filtrada (glass plate con una porosidad 4), la fase acuosa fue separada con un embudo de decantación. El volumen de la fase hexanica fue ajustada a 25 ml por adición de hexano. La mezcla final fue almacenada bajo atmósfera de argón a -20°C hasta su análisis.

Ejemplo 2

15

Selección de las lipasas

Las lipasas fueron seleccionadas según la actividad de esterificación o por la especificidad por los PUFAs (tabla 3). Para ello se llevó a cabo una reacción de esterificación de una mezcla de extracto comercial EPAX4510TG con alcohol láurico con diferentes lipasas, para calcular el GE, F_R , F_C en la fracción de AGLs. Las condiciones de reacción fueron: 178 mg de AGLs, 222 mg de alcohol (relación molar 1:2), 40 mg de lipasa y 4 ml de hexano, durante 24 h.

Los resultados de la tabla 3, muestran que la mayoría de los factores de concentración (F_C) son mayores que uno, esto indica que el EPA estaba concentrado en la fracción de AGLs no esterificados. El mayor FC fue obtenido por esterificación con la lipasa QLM (F_C , 1.60 a 40°C), Lipasa D (F_C , 1.27 a 40°C), Lipasa EU-093 (F_C , 1.30 y 1.47 a 40°C y 55°C, respectivamente), y Lipasa AK (F_C , 1.32 a 55°C). Además de la alta concentración de EPA, la recuperación (F_R) en la fracción de AGLs es importante para la concentración efectiva de EPA. Entre las lipasas que muestran un alto F_C , las que presentan una mayor proporción de EPA fueron la Lipasa AK (84% a 55°C) y la Lipasa D (66.7% a 40°C).

Ejemplo 3

Influencia del grado de esterificación en el factor de eficacia

Para comprobar la influencia que ejercía el grado de esterificación en el factor de eficacia se llevó a cabo la esterificación de una mezcla de AGLs de un extracto de EPAX4510TG con alcohol láurico con la lipasa EU-093, Lipasa D, y Lipasa AK bajo diferentes condiciones. Las condiciones de operación para la Lipasa EU-093 y Lipasa D fueron: 178 mg de FFA, 222 mg de alcohol (relación molar 1:2), 4 ml de hexano, 24 h; para obtener diferentes GE, los experimentos se llevaron a cabo con lipasas inmovilizadas y nativas a 40 y 55°C, usando de 40-400 mg de lipasa. Las condiciones de operación para la lipasa AK fueron 178-1780 mg de AGLs, 222-4440 mg de alcohol, relación molar AGLs/alcohol de 1:1, 1:2, 1:3 y 1:4, temperatura entre 40 y 55°C; 0, 4 y 10 ml de hexano, 24 y 48 h y 4-320 mg lipasa nativa o inmovilizada.

Los resultados se muestran en la figura 1, las lipasas D y EU-093, muestran un comportamiento similar y los valores máximos de F_{AE} no exceden de 0.2. Sin embargo, la lipasa AK dio un F_{AE} más alto, siendo el máximo mayor de 0.35, por lo tanto esta lipasa es la más conveniente entre las tres enzimas para la concentración de EPA.

Ejemplo 4

Selección de extractos de AGLs

La tabla 4 muestra la esterificación de las mezclas de AGLs a partir de EPAX4510TG y del extracto obtenido a partir de células de *P. tricornutum* con alcohol láurico catalizada por las lipasas AK.

Aunque el contenido inicial de EPA fue diferente, las producciones de recuperación fueron similares (F_R). El F_C fue bastante diferente pero tiene valores como el contenido de EPA en la fracción final de AGLs, que es bastante parecido en los dos sustratos. Todo ello demuestra que cuando el contenido de EPA en la mezcla inicial de AGLs es bajo, el F_C y GE requeridos para alcanzar un alto contenido en EPA son altos, y consecuentemente la intensidad de tratamiento. Además, la concentración final y la recuperación de EPA no dependen de la concentración de EPA en la mezcla inicial de AGLs. Estos resultados demuestran que la selectividad de la lipasa por el EPA se basa en el hecho de que el EPA es esterificado en una relación menor que otros AGLs, y por tanto, cuando la concentración de EPA es alta, su relación de esterificación también es alta, la selectividad de la lipasa es baja y el GE necesario para lograr la concentración de EPA es también baja.

ES 2 292 341 B1

Ejemplo 5

Influencia de la intensidad de tratamiento en el grado de esterificación (GE), contenido de EPA en la fracción de AGLs, y concentración, factores de concentración, recuperación y eficacia

Para determinar la influencia de la intensidad de tratamiento en los distintos factores, se llevó a cabo una esterificación de una mezcla de AGLs de un extracto celular de *P. tricornutum* con alcohol láurico y catalizado por lipasa AK. Las condiciones de reacción fueron: 178 mg de AGLs, 222 mg de alcohol (relación molar 1:2) y 4 ml de hexano, todo ello a 40°C, se combinaron distintas cantidades de lipasa y durante distintos tiempos. Los resultados se muestran en la tabla 5.

La figura 6, muestra la variación de F_{AE} con el GE. El FAE alcanza su valor máximo a 78% de GE, la tabla 4 muestra que para obtener un GE óptimo (78%) se debe aplicar una intensidad de tratamiento de aproximadamente 2400 mg de lipasa x h, para esta intensidad de tratamiento, se deben dar unos valores de F_C y F_R , de 3.1, 76% respectivamente. El valor de F_C corresponde con una pureza de EPA de 71% en la fracción final de AGLs.

Ejemplo 6

Influencia de la relación molar AGLs/alcohol láurico en el GE a diferentes temperaturas

Se llevó a cabo la esterificación de una mezcla de AGLs de un extracto de EPAX4510TG con alcohol láurico con la lipasa AK, las condiciones de operación fueron 178 mg de AGLs, 40 mg de lipasa nativa, 4 ml de hexano, durante 24 h.

El mayor GE fue obtenido con una relación molar de 1:2. Estos resultados están acorde con los obtenidos por otros autores (21). El GE disminuye cuando el contenido en alcohol aumenta lo cual puede ser atribuido a un incremento en la resistencia de transferencia de la masa, ya que el alcohol láurico aumentó la viscosidad de la mezcla de reacción obstruyendo la transferencia de sustratos y productos a la lipasa.

La figura 2 muestra también que los experimentos llevados a cabo a 55°C dieron un mayor GE que a 40°C. A mayor temperatura se indujo un mayor riesgo de oxidación de los PUFAs y una pérdida de solvente volátil como es el hexano, por lo que como no es necesario alcanzar un GE del 55-70% (donde F_{AE} es máximo) es aconsejable operar a 40°C.

Ejemplo 7

Influencia de la intensidad de tratamiento por 1 g de sustrato en el GE con diferentes volúmenes de hexano

Se llevó a cabo la esterificación de una mezcla de AGLs de un extracto de EPAX4510TG con alcohol láurico con la lipasa AK, las condiciones de operación fueron 178 mg de AGLs, 222 mg de alcohol láurico (relación molar 1:2), 40°C.

La presencia de un solvente orgánico es importante en las lipasas que catalizan reacciones, sin embargo, es interesante estudiar la posibilidad de eliminarlo para aplicaciones para la industria alimentaria, natraceutica y de la salud.

La figura 3 muestra la relación del GE con la intensidad de tratamiento por unidad de masa de sustrato, la cual se fue variando mediante la adición de diferentes cantidades de n-hexano. No se apreciaron diferencias entre el GE obtenido con 4 y 10 ml de hexano (que corresponde con una relación hexano/sustrato de 10 y 25 ml/g respectivamente), esto indica que esta variable no tiene influencia en la cinética de esterificación a este rango de concentración. Además también se ha observado que la velocidad en la esterificación con solvente es ligeramente más rápida que sin solvente, en la reacción sin n-hexano un ligero descenso en la relación de esterificación puede ser debido a un descenso en la relación de transferencia de masa por un incremento en la viscosidad de la mezcla de reacción (Nettletoi, J.A. (1991). Omega-3 fatty acids: comparison of plant and seafood sources in human nutrition. *Journal of the American Dietetic Association*, 91 (3): 331-337).

Ejemplo 8

Influencia del GE en el F_C y F_R de EPA en la fracción de AGLs sin esterificar, y en el grado de recuperación

La figura 4 muestra que el F_C máximo es alcanzado cuando el GE es del 75%, y la figura 5 muestra cuando la recuperación de EPA disminuye según el GE aumenta: cuando el GE es 75% (corresponde con el valor máximo de F_C) sólo el 45% de EPA es recuperado en la fracción de AGLs. Estos valores de F_C (o F_{AC}) y F_R fueron usados para calcular el F_{AE} que se muestra en la figura 1. El GE óptimo (dando el máximo valor de F_{AE}) fue aproximadamente 60%.

ES 2 292 341 B1

La figura 4 y 5 muestran que cuando el GE alcanza el 60%, F_C y F_R tienen valores de 1.7 y 72% respectivamente. Este F_C corresponde con una concentración de EPA en la fracción de AGLs de 73%.

La figura 3 muestra que este GE es obtenido con una IT por unidad de masa de sustrato de aproximadamente 2000 mg lipasaxh/g sustrato, por ejemplo en las siguientes condiciones experimentales: 178 mg de EPAX4510TG, 222 mg de alcohol láurico (relación molar 1:2), 4 ml de hexano, 40°C, y un IT de 800 mg de lipasa AKxh (800 mg de lipasa xh (178+222) mg de sustrato= 2000 mgxh/g de sustrato. Este experimento fue llevado a cabo cuatro veces, los valores de GE, F_C , F_R , F_{AE} se muestran en la tabla 4. Estos resultados corresponden con una mezcla final de AGLs con una concentración EPA de 71-72%, donde 72-74% del EPA inicial fue recuperado.

TABLA 1

Ácidos grasos	Fuentes
16:4n3 (4,7,10,13)	<i>Chlorella</i> , aceite de lacha
18:2n6 (9,12), LA	Aceites de semillas
18:3n3 (9,12,15), ALA	Aceites de semillas
18:4n3 (6,9,12,15), SA	<i>Chlorella</i> , arenque, lacha, salmonete
20:4n3 (8,11,14,17)	Aceite de lacha y de arenque
20:4n6 (5,8,11,14,), AA	Arenque, tejidos de reproducción y vísceras (hígado, riñones y corazón de ternera), hígado de buey y de cerdo, testículos de bovino
20:5n3 (5,8,11,14,17), EPA	Aceites de pescado, hígado de bacalao, tejidos de reproducción e hígado de ternera, hígado de buey, vísceras de cerdo
22:4n6 (7,10,13,16)	Hígado de buey, cerdo, salmonete, tejidos de reproducción de ternera
22:5n6 (4,7,10,13,16)	Sesos de buey, huevos, cerdo, tejidos de reproducción de ternera, salmonete
22:5n3 (7,10,13,16,19)	Hígado de bacalao, sardina, arenque, salmonete, cerdo, tejidos de reproducción de ternera, sesos de buey,
22:6n3 (4,7,10,13,16,19), DHA	Hígado de bacalao, aceites de pescado, arenque, atún, salmonete, sardina, hígado y sesos de buey, sesos de cerdo, tejidos de reproducción de ternera,
24:4n9 (6,9,12,15)	Sesos de buey, cerdo, tejidos de reproducción de ternera
26:2n6 (17,20)	<i>Speciospongia vesparia</i> , sesos de cerdo

ES 2 292 341 B1

TABLA 2

5	Acidos grasos	AGLs de <i>P. tricornutum</i> (wt%)	AGLs de EPAX4510TG (wt%)
	14:0	6.9	0
	16:0	20.1	4.1
10	16:1n7	19.1	1.7
	16:2n4	4.0	-
	16:3n4	5.6	-
15	16:4n1	0.7	0.5
	18:0	1.0	4.6
20	18:1n9	2.2	7.8
	18:1n7	1.6	5.6
	18:2n6	3.0	1.0
25	18:3n6	-	0.6
	18:3n3	0.5	0.7
	18:4n3	0.6	3.3
30	20:0	-	0.6
	20:1n9	-	4.0
35	20:2n6	-	0.9
	20:4n6	2.4	2.7
	20:4n3	0.9	1.7
40	20:5n3 (EPA)	23.0	43.1
	22:1n9	-	4.1
	21:5n3	-	1.4
45	22:5n3	3.8	2.4
	22:6n3	2.5	7.9
50	24:0	0.3	-
	Others	1.8	1.4

55

60

65

ES 2 292 341 B1

TABLA 3

	Lipasa	T (°C)	AGLs (ácidos grasos no esterificados)		
			GE (%)	F _R (%)	F _C
5	M	40	37.8	73.0	1.07
	D	40	53.0	66.7	1.27
10	EU-034	40	58.1	52.9	1.18
	AK	40	17.0	90.9	1.14
15	EU-093	40	72.3	38.8	1.30
	OFex	40	39.2	70.3	1.14
	QLMex	40	90.3	16.5	1.60
20	M	55	53.2	52.4	0.94
	D	55	25.8	83.0	1.11
25	EU-034	55	74.8	34.3	1.17
	AK	55	32.4	84.0	1.32
	EU-093	55	77.5	38.2	1.47
30	OFex	55	23.4	83.0	1.07
	QLMex	55	37.5	68.2	1.04
35	Lipozyme RMIM ⁽¹⁾	55	87.9	11.9	1.0
	Novozym 435 ⁽²⁾	40	54.8	47.0	0.9

(1) 2.5 mg y 24 horas (2) 5 mg y horas.

TABLA 4

	EPAX4510TG	<i>P. tricornutum</i>	
50	Contenido inicial de EPA (%)	43.1	23.0
	Intensidad de tratamiento (mg·h)	816	2400
	GE óptimo	59.3-60.7	77.3-79.1
	F _C	1.66-1.68	3.0-3.2
55	F _R (%)	72-74	74-77
	F _{AE} Máximo	0.36	0.46-0.49
60	Contenido final EPA (%) ^f	71.5-72.4	69.0-73.6

65

ES 2 292 341 B1

TABLA 5

	Tiempo (h)	Lipasa (mg)	IT (mg · h)	GE (%)	C _{EA} (%)	F _C	F _R (%)	F _{AE} (0 - 1)
5	24	20	480	5.2	24.9	1.04	98.4	0.01
10	23	34	782	26.8	33.5	1.33	97.6	0.10
	24	34	816	32.1	31.9	1.39	95.1	0.11
	24	51	1224	55.4	49.5	1.95	92.1	0.26
15	48	34	1632	63.9	59.2	2.47	89.3	0.39
	48	51	2448	76.8	75.9	3.17	73.4	0.48
20	48	68	3264	88.1	73.4	3.06	36.5	0.23

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento para la purificación de ácido eicosapentaenoico donde dicha purificación se realiza mediante la concentración del ácido eicosapentaenoico en la fracción de ácidos grasos libres mediante la esterificación de un extracto lipídico catalizado por lipasas.

10 2. Procedimiento para la purificación de ácido eicosapentaenoico según la reivindicación 1 donde las lipasas son seleccionadas mediante la determinación del factor adimensional de eficacia.

15 3. Procedimiento para la purificación de ácido eicosapentaenoico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la reacción se hace en presencia de un disolvente.

20 4. Procedimiento para la purificación de ácido eicosapentaenoico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el extracto lipídico es un extracto de microalgas.

25 5. Procedimiento para la purificación de ácido eicosapentaenoico según la cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el extracto lipídico es un extracto de pescado.

30 6. Un procedimiento para la cuantificación de la eficacia de los catalizadores para concentrar y recuperar de forma simultánea un ácido graso poliinsaturado en una fracción de ácidos grasos libres según lo descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende las siguientes etapas:

35 a) determinar la relación entre la concentración de ácido graso poliinsaturado en la fracción de ácidos grasos libres sin esterificar y la fracción de ácido graso poliinsaturado en la fracción de ácidos grasos inicial,

40 b) determinar el porcentaje de ácido graso poliinsaturado recuperado en la fracción de ácidos grasos libres sin esterificar con respecto al contenido del mismo en la mezcla final.

45 7. Un procedimiento para la cuantificación de la eficacia de los catalizadores para concentrar y recuperar de forma simultánea un producto en una fracción según la reivindicación 6, donde los catalizadores son enzimas.

50

55

60

65

70

75

80

FIG 1

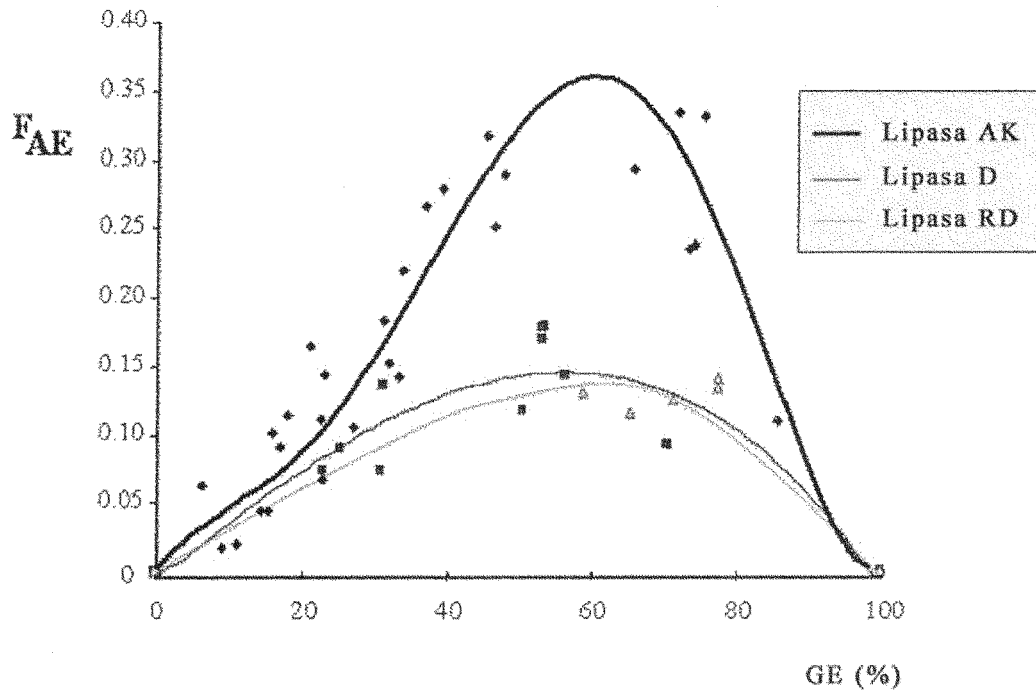


FIG 2

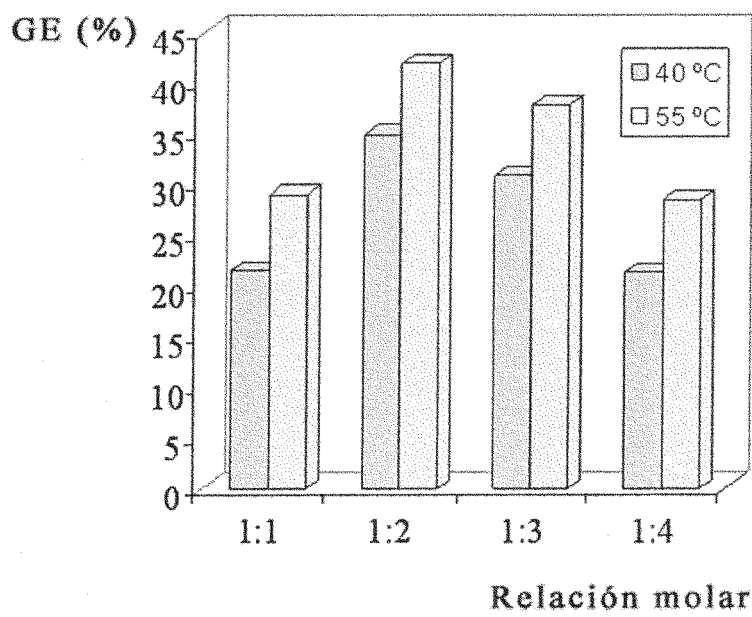


FIG 3

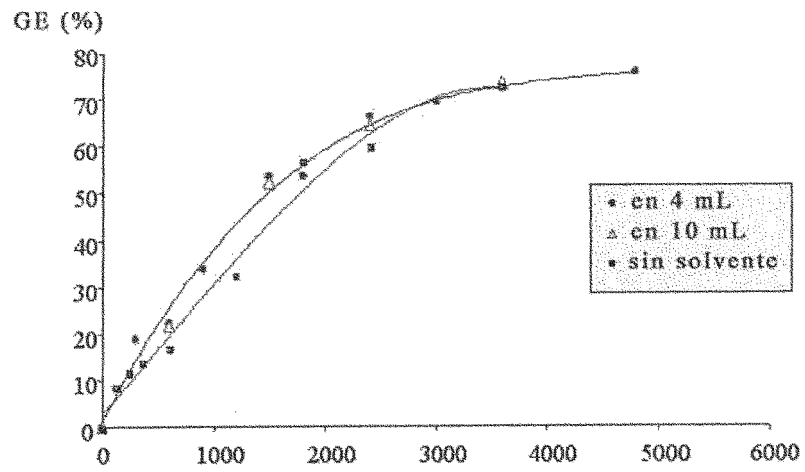


FIG 4

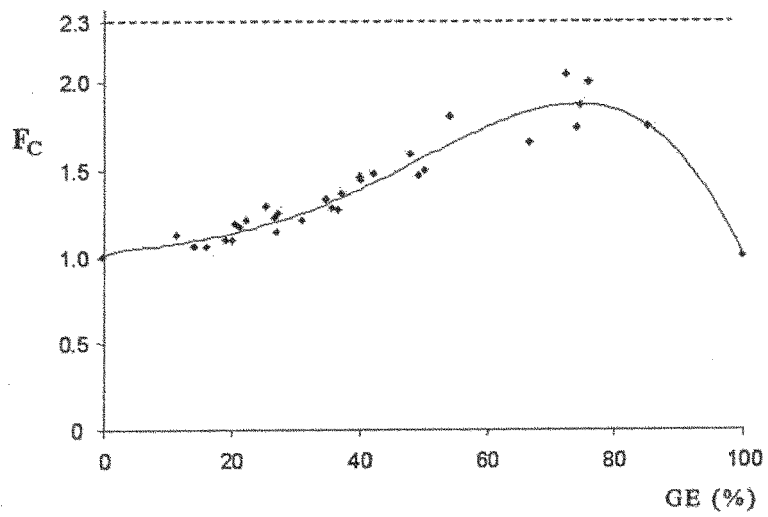


FIG 5

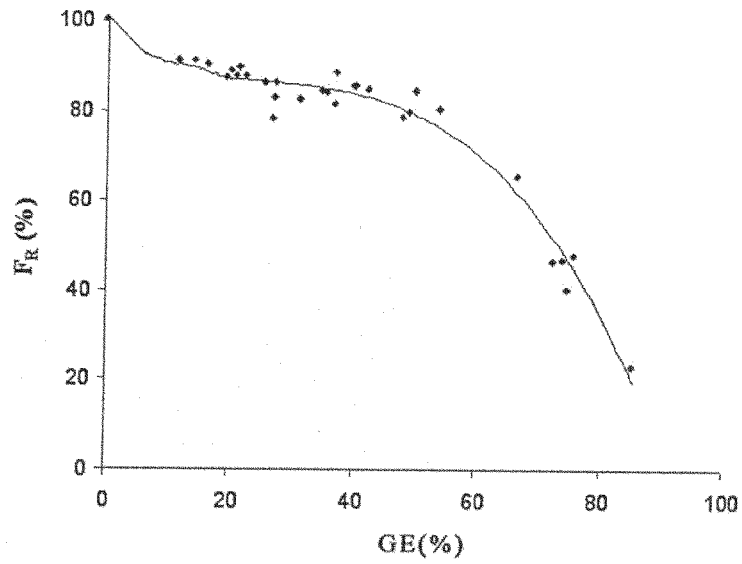
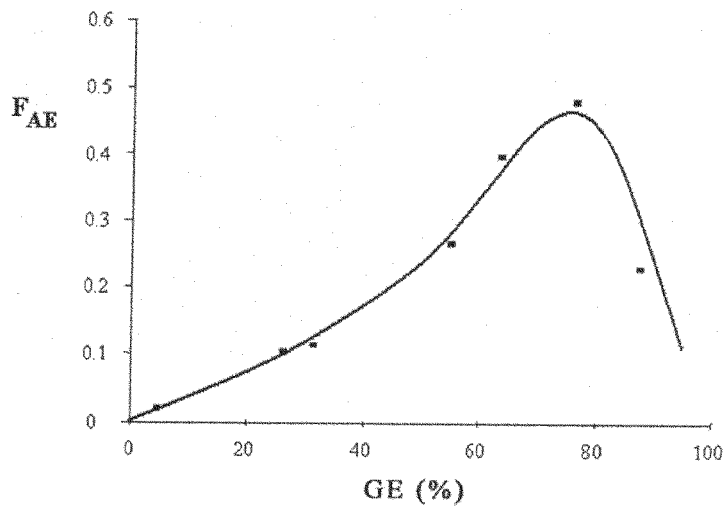


FIG 6





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 292 341

② Nº de solicitud: 200600777

③ Fecha de presentación de la solicitud: 13.03.2006

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **C11C 1/00** (2006.01)
C12S 3/18 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2004043894 A1 (PRONOVA BIOCARE AS) 27.05.2004, todo el documento.	1-5
X	WO 0049117 A1 (NORSK HYDRO ASA) 24.08.2000, todo el documento.	1-5
X	ESTEBAN, L. et al.: "Synthesis of Polyunsaturated Fatty Acid-Enriched Triglycerides by Lipase-Catalyzed Esterification", JAOCS(1998), vol.75, (10), pp.: 1329-1337, todo el documento.	1-5
X	FU, X. et al.: "Selectivity of Fatty Acid Incorporation into Acylglycerols in Esterification Reactions using Rhizomucor miehei and Burkholderia cepacia Lipases", Food Res. Int. (2004), vol.37, pp.:651-657; ver pág. 653, secciones 2.4 y 2.5.	6,7

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

31.01.2008

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

1/1