

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 381**

51 Int. Cl.:

**A61K 6/00**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **10177024 .6**

96 Fecha de presentación: **05.05.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **2266525**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.12.2010**

54 Título: **Lípidos de alta calidad y métodos para su producción mediante liberación enzimática a partir de biomasa**

30 Prioridad:  
**03.05.2002 US 377550 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**23.11.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**23.11.2012**

73 Titular/es:  
**MARTEK BIOSCIENCES CORPORATION (100.0%)**  
**6480 Dobbin Road**  
**Columbia, MD 21045, US**

72 Inventor/es:  
**KOBZEFF, JOSEPH M. y**  
**WEAVER, CRAIG A.**

74 Agente/Representante:  
**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 391 381 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Lípidos de alta calidad y métodos para su producción mediante liberación enzimática a partir de biomasa

5 **Referencia a solicitud relacionada**

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad según el 35 U.S.C. § 119(e) de la solicitud provisional estadounidense con número de serie 60/377.550, presentada el 3 de mayo de 2002.

10 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a lípidos de alta calidad y, en particular, a lípidos con bajos índices de anisidina. Se proporcionan métodos para producir lípidos de alta calidad que incluyen la etapa de liberar lípidos a partir de biomasa, tales como biomasa de algas, usando tratamiento enzimático.

15

**Antecedentes de la invención**

Se han empleado diversos métodos para extraer lípidos a partir de biomasa. Las técnicas incluyen extracción directa de la biomasa con disolventes, calentamiento, ondas de presión generadas mediante arcos eléctricos, saponificación directa mediante KOH y etanol, sonicación, congelación y trituración y molinos de bolas. Por ejemplo, puede secarse la biomasa y extraerse el lípido con un disolvente tal como hexano. Alternativamente, puede someterse un caldo de fermentación microbiana a condiciones extremas de pH y/o temperatura o puede usarse equipo adicional tal como un homogeneizador para romper las células.

20

25

Los problemas de los métodos anteriores incluyen escasa calidad del producto debido a condiciones químicamente agresivas de alta temperatura y alto pH, altos costes debido a la necesidad de secar la biomasa o de equipo adicional tal como homogeneizadores y recipientes de presión.

30

Los aromas a "pescado" y "pintura" asociados con muchos ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) que se encuentran en los lípidos se deben principalmente a la oxidación de los dobles enlaces en los ácidos grasos. Estas notas de aroma y olor se consideran normalmente defectos que pueden impedir su uso en alimentos u otras aplicaciones. La estabilidad y el estado oxidativos de un lípido o material que contiene lípido pueden medirse de varias maneras. Las técnicas de medición convencionales incluyen "índice de anisidina", "índice de peróxido", "índice de estabilidad oxidativa", "Rancimat" y análisis de espacio de cabeza mediante cromatografía de gases para productos de oxidación. Está disponible información sobre estas diferentes técnicas a partir de la AOCS (*American Oil Chemists' Society*, (Sociedad Americana de Químicos del Aceite)) así como a partir de otras fuentes.

35

40

El estado oxidativo del lípido o material que contiene lípido se ve fuertemente afectado por las condiciones de procesamiento usadas para preparar el material. Para materiales alimenticios, las condiciones durante el procesamiento así como los ingredientes reales y la calidad de los ingredientes afectarán al estado de oxidación. Para lípidos derivados de fermentación (por ejemplo, lípidos obtenidos a partir de microbios hechos crecer en fermentadores, estanques, etc.), los ingredientes (fermentación y fermentación posterior) usados así como las condiciones durante la extracción y fermentación del lípido afectarán a la calidad. Otras fuentes de AGPI, tales como cultivos agrícolas y fuentes animales, también se verán afectadas por las condiciones de procesamiento usadas para obtener los lípidos y materiales que contienen lípido.

45

**Sumario de la invención**

La presente solicitud se refiere a un lípido que comprende ácido graso poliinsaturado, teniendo el lípido un índice de anisidina de 1,5 o inferior, y en diversas realizaciones el índice de anisidina puede ser de tan sólo 0,3 o inferior. El ácido graso poliinsaturado en el lípido puede ser un ácido graso poliinsaturado de cadena larga, que tiene una longitud de cadena de al menos 20 o al menos 22, y puede tener al menos tres o al menos cuatro dobles enlaces. Más particularmente, el ácido graso poliinsaturado puede ser ácido docosahexaenoico, ácido docosapentaenoico o ácido araquidónico.

55

El lípido puede obtenerse a partir de biomasa, por ejemplo, a partir de una planta o microorganismo. Por ejemplo, el lípido puede obtenerse a partir de algas, bacterias, hongos o protistas. En realizaciones preferidas, el lípido puede obtenerse a partir de microorganismos del género *Mortierella*, el género *Cryptocodium* o el orden *Thraustochytriales*. Además, el lípido puede comprender un monoacilglicérido, un diacilglicérido o un triacilglicérido.

60

Realizaciones adicionales de la presente invención incluyen productos seleccionados de complementos dietéticos, productos alimenticios, formulaciones farmacéuticas, leche animal humanizada o preparado para lactantes, incluyendo los productos un lípido que comprende ácido graso poliinsaturado y que tiene un índice de anisidina de 1,5 o inferior.

65

Una realización adicional de la presente invención es un método de obtención de un lípido que contiene ácido graso

poliinsaturado que incluye proporcionar una biomasa que contiene un lípido que contiene ácido graso poliinsaturado, poner en contacto la biomasa con una enzima y recuperar el lípido.

5 Un método adicional de la presente invención es un método para liberar un lípido a partir de una biomasa que comprende liberar el lípido a una temperatura de aproximadamente 10°C a aproximadamente 80°C a un nivel de pH de desde aproximadamente pH 5 hasta aproximadamente pH 9. Este método se realiza en ausencia sustancial de un disolvente de extracción.

### 10 Descripción detallada de la invención

Según una realización de la presente invención, se proporciona un lípido de alta calidad. En particular, el lípido tiene un bajo índice de anisidina. Preferiblemente, el índice de anisidina es de 1,5 o inferior, más preferiblemente de 1 o inferior, más preferiblemente de 0,5 o inferior y más preferiblemente de 0,3 o inferior. El índice de anisidina puede considerarse como una medida del historial oxidativo de un lípido. Mayores índices indican un lípido que ha experimentado más estrés oxidativo. A medida que se oxida un lípido, se convierte normalmente en un peróxido. Este peróxido se convierte normalmente en un aldehído o cetona. El índice de anisidina es una medida de estos productos de oxidación secundarios. Los lípidos que contienen ácido graso poliinsaturado son muy sensibles a la oxidación y esta oxidación puede conducir a aromas no deseados. Se han empleado métodos para eliminar estos aromas no deseados, pero estos métodos no eliminan todos los productos de oxidación que pueden actuar entonces como precursores de aromas no deseados, y de oxidación. Como resultado, estos métodos de mejora del aroma sólo conducen a la mejora temporal del aroma. El índice de anisidina es una medida de estos precursores de aromas no deseados y de oxidación. El método analítico para medir el índice de anisidina está disponible a partir de la AOCS (American Oil Chemists' Society).

25 Según otra realización de la presente invención, se proporciona un proceso para liberar lípidos. El proceso incluye una etapa de liberación de lípidos usando un tratamiento enzimático para, por ejemplo, la degradación de las paredes celulares del material que contiene lípido. Preferiblemente, los lípidos se liberan a partir de una biomasa que contiene lípido usando una enzima proteasa, mediante lo cual se proteolizan componentes proteicos del material que contiene lípido, u otra enzima que sea apropiada para descomponer o reaccionar con el material que contiene lípido.

Una realización adicional de la presente invención es un proceso que utiliza tensioactivos además de las enzimas para liberar los lípidos a partir del material que contiene lípido. Los inventores han encontrado sorprendentemente que el uso de tensioactivos junto con tratamiento enzimático puede permitir condiciones de reacción más suaves que con enzimas solas para la liberación de los lípidos. Se añaden preferiblemente tensioactivos, tales como polisorbato 80, mono y diglicéridos, u otros tensioactivos, aproximadamente al mismo tiempo que la enzima. Alternativamente, el tensioactivo puede añadirse antes o después de la enzima. En esta realización, preferiblemente se libera el lípido a partir de la biomasa sin usar condiciones extremas de temperatura o pH y sin usar equipo adicional tal como un homogeneizador o secado de la biomasa antes de la eliminación del lípido. Por ejemplo, el tratamiento enzimático puede realizarse a temperaturas inferiores a aproximadamente 80°C, más preferiblemente inferiores a aproximadamente 70°C e incluso más preferiblemente, inferiores a aproximadamente 65°C, y en condiciones de pH de aproximadamente 5-9.

45 El uso de enzimas proteasas o enzimas proteasas en combinación con tensioactivos, proporciona una manera económica y simple de liberar el lípido a partir de la biomasa en condiciones suaves favorables para preparar lípido de alta calidad. Entonces, puede aislarse el lípido del resto del caldo de fermentación mediante centrifugación de la mezcla. En algunos casos, se incorporará el lípido en una emulsión. Para algunas aplicaciones, la propia emulsión podría ser el producto final. Para otras aplicaciones, se trataría la emulsión para liberar el lípido para la recuperación por separado. Se enseñan técnicas en la solicitud de patente estadounidense n.º 09/766.500 e incluyen, pero no se limitan a, dilución, adición de un disolvente, cambios de temperatura y congelación.

55 El uso de una enzima proteasa puede ayudar a descomponer proteínas estabilizantes de emulsión presentes, ayudando de este modo en la ruptura de una emulsión. Además, el uso satisfactorio de una proteasa para la liberación de lípido a partir de microalgas es sorprendente porque, las microalgas tienden a tener un bajo contenido en proteínas (~15-22% en comparación con ~55% para *E. coli*), y tienen una estructura celular muy robusta debido a la presencia de sílice y polisacáridos tales como celulosa.

60 Esta etapa de procesamiento también permite la producción de lípidos que contienen ácido graso poliinsaturado (AGPI) de cadena larga de calidad extremadamente alta tal como se mide mediante el índice de anisidina. El motivo es que el proceso puede realizarse fácilmente bajo una atmósfera inerte, con bajas temperaturas y condiciones no reactivas.

65 En una realización particular, usando tratamiento proteolítico del material que contiene lípido sin un tensioactivo, el tratamiento proteolítico puede realizarse a altas temperaturas, suficientes para lograr niveles deseables de liberación de lípido. Por ejemplo, en esta realización, el tratamiento enzimático se realiza a temperaturas de al menos aproximadamente 30°C, más preferiblemente de al menos aproximadamente 40°C y lo más preferiblemente de al

menos aproximadamente 50°C. Debe reconocerse sin embargo, que a mayores temperaturas, puede producirse degradación de los lípidos. Por tanto, debe seleccionarse una temperatura de manera que se logre una liberación de lípidos adecuada sin niveles inaceptables de degradación de lípidos.

5 Fuentes de ácidos grasos poliinsaturados preferidas pueden ser cualquier fuente que pueda producir la liberación mediante enzimas como en la presente invención. Las fuentes de ácidos grasos poliinsaturados preferidas incluyen fuentes de biomasa, tales como fuentes animales, vegetales y/o microbianas. Tal como se usa en el presente documento, el término "lípidos" incluye fosfolípidos; ácidos grasos libres; ésteres de ácidos grasos; triacilgliceroles; diacilglicéridos; monoacilglicéridos; lisofosfolípidos; jabones; fosfátidos; esteroides y ésteres de esteroides; carotenoides; xantofilas (por ejemplo, oxicarotenoides); hidrocarburos; y otros lípidos conocidos por un experto habitual en la técnica. Los ejemplos de fuentes animales incluyen animales acuáticos (por ejemplo, peces, mamíferos marinos, crustáceos, rotíferos, etc.) y lípidos extraídos de tejidos animales (por ejemplo, cerebro, hígado, ojos, etc.). Los ejemplos de fuentes vegetales incluyen macroalgas, linazas, colzas, maíz, onagra, soja y borraja. Los ejemplos de microorganismos incluyen algas, protistas, bacterias y hongos (incluyendo levaduras). El uso de una fuente de microorganismos, tal como algas, puede proporcionar ventajas organolépticas, es decir, los ácidos grasos procedentes de una fuente de microorganismos pueden no tener ni el sabor ni el olor a pescado que tienden a tener los ácidos grasos procedentes de una fuente de pescado. Más preferiblemente, la fuente de ácido grado de cadena larga comprende algas.

20 Preferiblemente, cuando microorganismos son la fuente de ácidos grasos de cadena larga, los microorganismos se cultivan en un medio de fermentación en un fermentador. Alternativamente, los microorganismos pueden cultivarse de manera fotosintética en un fotobiorreactor o estanque. Preferiblemente, los microorganismos son microorganismos ricos en lípidos, más preferiblemente, los microorganismos se seleccionan del grupo que consiste en algas, bacterias, hongos y protistas, más preferiblemente, los microorganismos se seleccionan del grupo que consiste en algas doradas, algas verdes, dinoflagelados, levaduras, hongos del género *Mortierella* y *Stramenopiles*. Preferiblemente, los microorganismos comprenden microorganismos del género *Cryptocodinium* y el orden *Thraustochytriales* y hongos filamentosos del género *Mortierella*, y más preferiblemente, los microorganismos se seleccionan del género *Thraustochytrium*, *Schizochytrium* o mezclas de los mismos, más preferiblemente, los microorganismos se seleccionan del grupo que consiste en microorganismos que tienen las características identificativas del número ATCC 20888, el número ATCC 20889, el número ATCC 20890, el número ATCC 20891 y el número ATCC 20892, cepas de *Mortierella schmuckeri* y *Mortierella alpina*, cepas de *Cryptocodinium cohnii*, cepas mutantes derivadas de cualquiera de los anteriores, y mezclas de los mismos. Debe indicarse que muchos expertos reconocen que *Ulkenia* no es un género independiente de los géneros *Thraustochytrium* y *Schizochytrium*. Por consiguiente, tal como se usa en el presente documento, los géneros *Thraustochytrium* y *Schizochytrium* incluirán *Ulkenia*. Puede encontrarse Información referente a tales algas en las patentes n<sup>os</sup>. 5.407.957, 5.130.242 y 5.340.594, que se incorporan al presente documento como referencia en su totalidad.

Los lípidos recuperados mediante la presente invención incluyen lípidos que comprenden un ácido graso poliinsaturado, más particularmente, un ácido grado poliinsaturado de cadena larga e incluso más particularmente, un ácido graso poliinsaturado presente en dicho lípido que tiene una longitud de cadena de carbonos de al menos 20 ó 22. Tal ácido graso poliinsaturado presente puede tener al menos 3 o al menos 4 dobles enlaces. Más particularmente, el ácido grado poliinsaturado puede incluir ácido docosahexaenoico (al menos el 10, 20, 30 o el 35 por ciento en peso), ácido docosapentaenoico (al menos el 5, 10, 15 o el 20 por ciento en peso) y/o ácido araquidónico (al menos el 20, 30, 40 o el 50 por ciento en peso). Los ácidos grasos poliinsaturados incluyen ácidos grasos libres y compuestos que comprenden residuos de AGPI, incluyendo fosfolípidos; ésteres de ácidos grasos; triacilgliceroles; diacilglicéridos; monoacilglicéridos; lisofosfolípidos; fosfátidos; etc.

Para diferentes materiales que contienen aceite, pueden emplearse diferentes enzimas y condiciones de reacción. Para estos diferentes materiales, un importante criterio de selección de enzima es seleccionar una enzima que atacará y degradará una parte del material (tal como las proteínas, polisacáridos, pared celular, membrana externa celular, capa de peptidoglicano, celulosa, quitina, hemicelulosa, lignina, compuestos relacionados con lignina, etc.) es decir, impidiendo de otro modo la recuperación del aceite. Preferiblemente, se usan enzimas proteasas no específicas tales como tripsina, quimiotripsina, o similares, para degradar componentes proteicos de los materiales que contienen aceite y pueden usarse enzimas carbohidrasas tales como amilasa para degradar componentes de hidratos de carbono de los materiales que contienen aceite. La selección de las condiciones de reacción, incluyendo el tipo de enzima, la concentración de enzima, la temperatura, el pH, la actividad de agua, la concentración de otros reactivos, el tiempo de reacción, etc. dependerán en parte de la enzima específica y el material a partir del que está liberándose el lípido. Estas condiciones pueden determinarse fácilmente a partir de información acerca de la enzima (y disponible normalmente a partir del proveedor o en la bibliografía) o determinarse por algún experto en la técnica. Las temperaturas típicas pueden oscilar entre aproximadamente 20-80°C, aunque algunas enzimas especiales pueden ser suficientemente activas y estables para su uso fuera de este intervalo. Las concentraciones de enzima típicas pueden ser de tan sólo el 0,01% a varios tantos por cientos. La velocidad de reacción está relacionada con la concentración de enzima, permitiendo las mayores concentraciones tiempos de reacción más cortos. En algunas situaciones, puede ser posible usar una concentración incluso menor, tal como cuando una enzima particular es extremadamente activa o estable o cuando pueden ser prácticos tiempos de reacción muy largos.

Preferiblemente, se liberan los lípidos de manera eficaz a partir de organismos de *Schizochytrium sp* tratando las células con una enzima proteasa. Es sorprendente que esta clase particular de enzimas sea eficaz para este organismo debido a la cantidad relativamente pequeña de proteína que se encuentra normalmente en la pared celular de este organismo. Pueden liberarse lípidos a partir de biomasa, y preferiblemente microorganismos, tratando las células con enzimas u otros agentes o mediante otros métodos que atacan otros componentes de la pared celular, tal como polisacáridos, o la bicapa lipídica. Este tratamiento con enzimas proporciona un método en condiciones suaves que permite la recuperación de lípidos de alta calidad. Otros métodos para la liberación de lípidos que pueden usarse, solos o en combinación con tratamiento enzimático, incluyen tratamiento con detergentes, choque osmótico, ciclos de congelación/descongelación, autólisis, homogeneización, sonicación y tratamiento térmico suave.

Una realización preferida del proceso de la presente invención incluye:

- Obtener organismos unicelulares que portan lípido

- Tratar con proteasa o una combinación de tensioactivo y proteasa

- Separar el lípido del caldo (puede ser una emulsión)

- puede requerir tratamiento adicional con un disolvente orgánico polar, sal, agente de precipitación, otra enzima (proteasa u otra clase), calentamiento, enfriamiento.

- Si el lípido procedente de la etapa anterior está en forma de una emulsión, este producto puede usarse "tal cual" o secarse y usarse o tratarse para liberar el lípido de la emulsión

- el tratamiento puede incluir tratamiento con un disolvente orgánico polar, sal, agente de precipitación, otra enzima (proteasa u otra clase), calentamiento, enfriamiento, etc.

- El lípido entonces puede secarse, refinarse, blanquearse, desodorizarse y/o hacerse reaccionar según sea necesario.

El lípido también puede tratarse con antioxidantes y/o agentes de captura de iones metálicos (tales como agentes quelantes, resina de intercambio iónico, agentes de precipitación) en cualquier punto antes, durante o después del proceso.

Tal como se indicó anteriormente, la presente invención abarca el uso de una proteasa en presencia de un tensioactivo para recuperar lípido a partir de una biomasa. Los tensioactivos adecuados incluyen, pero no se limitan a: fosfolípido, lisofosfolípido, monoglicérido, diglicéridos, glicéridos mixtos, glicéridos parciales, jabones, ácidos grasos, sales de ácidos grasos, aminas, antiespumante, ácidos o sales de ácido sulfónico, detergentes, polisorbatos (por ejemplo, monooleato de polietileno-sorbitano), ácidos y ésteres alifáticos, moléculas orgánicas polares, alcoholes, sulfatos y sulfonatos, compuestos que contienen nitrógeno (por ejemplo, aminas, amidas, poliamidas), fosfatos (por ejemplo, difosfato de alquil-alquileo, fosfato de tributilo), siliconas (por ejemplo, tri y tetra-alkilsilanos, polímero de silicona que contiene sílice, polímeros de dimetil-silicona, metil-siliconas), sulfuros y tioderivados, compuestos halogenados, triacilgliceroles, ceras grasas de cadena larga (por ejemplo, aceites y ceras vegetales), aceites minerales, derivado sulfatado de triacilgliceroles y aceites minerales, bentonita, y fosfato de monosodio mezclado con ácido bórico y carbonato de etilo.

En una realización adicional, el proceso puede realizarse con una combinación de enzimas. Más específicamente, pueden usarse una proteasa y una lipasa. Una lipasa es una enzima que hidroliza glicéridos. Por tanto, es necesario tener cuidado para evitar niveles inaceptables de degradación de glicéridos en el producto lipídico. Por ejemplo, una lipasa hidrolizará un triglicérido produciendo un ácido graso libre y un diglicérido. Se cree que este mecanismo, sin pretender limitarse a la teoría, es beneficioso hasta cierto grado porque los productos de la degradación enzimática actúan como tensioactivos teniendo los beneficios descritos anteriormente en la realización de la invención que implica el uso directo de tensioactivos. Sin embargo, existe la posibilidad de que el producto lipídico pudiera degradarse de manera inaceptable por la lipasa. Por tanto, realizaciones adicionales implican el uso de pequeñas cantidades de lipasa o condiciones en las que la lipasa sólo es activa una pequeña duración de tiempo. Tal control de la actividad lipasa podría controlarse por ejemplo, mediante el uso de enzimas sensibles a la temperatura o la introducción de inhibidores de lipasa.

En otra realización de la presente invención, los procesos de la presente invención se combinan con técnicas adicionales que reducen la oxidación, incluyendo una o más de: exclusión de aire (y oxígeno) y otros agentes oxidantes, procesamiento con condiciones suaves (temperatura moderada, pH moderado, tiempos de procesamiento cortos, etc.), exclusión de iones metálicos tales como cobre y hierro, exclusión de lípidos oxidados previamente (incluso si se purifican posteriormente), exclusión de precursores de oxidación y la presencia de compuestos antioxidantes (tales como tocoferoles, tocotrienoles, BHA, camisol, ácido carnósico, ácido ascórbico, ésteres de ácido L-ascórbico (incluyendo palmitato de L-ascorbilo, estearato de L-ascorbilo, oleato de L-ascorbilo),

romero, etc. así como ésteres o derivados de estos compuestos), para obtener lípidos mínimamente oxidados.

En algunos casos, después de que se liberen los lípidos de la biomasa, los lípidos pueden separarse de los materiales no deseados (por ejemplo, residuos celulares), tal como mediante centrifugación, u otros métodos apropiados. En otros casos, puede añadirse un agente tal como un alcohol u otro disolvente orgánico polar para facilitar la separación del lípido liberado del otro material. Todavía en otros casos, puede añadirse un disolvente que disolverá el lípido y facilitará la separación del lípido liberado del otro material, por ejemplo, mediante extracción con disolventes. Pueden encontrarse técnicas para separar los lípidos de materiales no deseados en la patente estadounidense número 5.928.696, la solicitud de patente estadounidense número 09/766.500 y las solicitudes PCT número US 01/12047 y US 01/12049. Otra realización de la invención implica el uso de una combinación del tratamiento con enzima o la enzima más tratamiento con tensioactivo, junto con homogeneización. Esta combinación en algunos casos puede lograr una mayor calidad y/o un mayor rendimiento que con homogeneización o tratamiento con enzima solos. Se cree que la homogeneización puede facilitar la reacción enzimática permitiendo un contacto más íntimo entre la enzima y su sustrato. También se cree que el tratamiento con enzima puede facilitar la homogeneización mediante el debilitamiento de las paredes celulares y permitiendo el uso de condiciones de homogeneización menos extremas (presión o cizallamiento). El uso de homogeneización con el proceso con enzima o enzima-tensioactivo puede permitir el uso de condiciones que son más suaves químicamente de lo que sería posible sin la homogeneización. En otros casos, este proceso combinado puede permitir el uso de una menor presión (y también menor coste) de homogeneización.

Según una realización adicional de la presente invención, los procesos descritos previamente pueden emplearse en material que porta lípido que se ha secado antes de la retirada de lípido. Aunque se esperaría normalmente el proceso de mayor calidad y menor coste a partir del material que no se ha secado, hay casos en los que sería ventajoso secar el material o bien antes de o bien en algún punto intermedio durante el proceso, antes de la separación del lípido. El uso de los procesos con secado descritos previamente puede proporcionar una mejora parcial en la calidad y/o el coste con respecto a procesos que incluyen secado y no incluyen los procesos de la invención. Algunos ejemplos de cuándo sería apropiada esta etapa de secado son cuando la instalación para la separación del lípido está ubicada alejada de la instalación de fermentación u otra aguas arriba, o cuando existen dificultades de programación entre la instalación de separación del lípido y la instalación aguas arriba, o cuando el material que contiene lípido debe almacenarse antes de la separación del lípido.

En un aspecto de la presente invención, se usa el lípido en un producto final seleccionado del grupo que consiste en un complemento dietético, un producto alimenticio, una formulación farmacéutica, una leche animal humanizada y un preparado para lactantes. Una formulación farmacéutica puede incluir, pero no se limita a: una formulación antiinflamatoria, un agente quimioterápico, un excipiente activo, un fármaco contra la osteoporosis, un antidepresivo, un anticonvulsivo, un fármaco contra *Helicobacter pylori*, un fármaco para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa, un fármaco para el tratamiento de una enfermedad hepática degenerativa, un antibiótico y una formulación hipocolesterolemizante. En un aspecto, se usa el producto final para tratar un estado seleccionado del grupo que consiste en: inflamación crónica, inflamación aguda, trastorno gastrointestinal, cáncer, caquexia, reestenosis cardíaca, trastorno neurodegenerativo, trastorno degenerativo del hígado, trastorno de los lípidos en sangre, osteoporosis, osteoartritis, enfermedad autoinmunitaria, preeclampsia, parto prematuro, maculopatía relacionada con la edad, trastorno pulmonar, esquizofrenia, depresión, trastorno de mantenimiento de peso y peroxisomal. Los siguientes ejemplos se proporcionan con el fin de ilustración y no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

Se diluyó caldo de fermentación de *Schizochytrium sp.* y se tamponó tal como sigue: se combinaron 25 ml de caldo con 65 ml de agua DI, entonces se añadieron 10 ml de tampón de (ácido 2-[N-morfolino]etanosulfónico 1,0 M) de pH 6,0.

A diferentes alícuotas de esta mezcla de caldo, se les añadieron diferentes combinaciones de enzima y tensioactivo. Después de las adiciones de enzima y tensioactivo, se incubaron las muestras a 45°C durante 1,5 h, y luego se examinaron al microscopio para determinar el grado de lisis. Los resultados se muestran a continuación:

Enzima*	Tensioactivo	Grado de lisis
Ninguna	Polisorbato 80	Sin lisis
Viscozyme® L	Polisorbato 80	Sin lisis
Alcalase® 2.4L FG, Viscozyme® L	Polisorbato 80	En su mayoría lisadas
Alcalase® 2.4L FG	Polisorbato 80	Prácticamente todas lisadas

Viscozyme® L	Ninguno	Sin lisis
Alcalase® 2.4L FG	Ninguno	En su mayoría no lisadas

\*Las enzimas proceden ambas de Novozymes North America, Inc. de Franklinton, NC.

Este ejemplo demuestra tanto la lisis satisfactoria del organismo con enzimas como la mejora de la lisis con la inclusión de un tensioactivo, polisorbato 80.

5

Ejemplo 2

Se diluyó caldo de fermentación de *Schizochytrium sp.* y se tamponó tal como en el ejemplo 1.

10 Se añadieron una proteasa comercial (Alcalase® 2.4 L FG, disponible de Novozymes North America, Inc. de Franklinton, NC) y una carbohidrasa comercial (Viscozyme® L, disponible de Novozymes North America, Inc. de Franklinton, NC) al caldo diluido y tamponado. Se dividió esta mezcla de caldo y se añadieron diferentes tensioactivos, tal como sigue:

15 1. Polisorbato 80

2. Laurilsulfato de sodio

20 3. Mono y diglicéridos (Dimodan CO-K de Danisco de New Century, KA)

Tras la adición de tensioactivo, se calentó cada muestra en un baño de agua caliente (75°C) durante aproximadamente 5 min. Entonces se mantuvo cada muestra durante la noche a temperatura ambiente con mezclado en un mezclador para hematología/química de Fisher. Se examinaron las muestras bajo un microscopio para determinar el grado de lisis. Los resultados se muestran a continuación:

25

Tensioactivo	Grado de lisis
Polisorbato 80	~100%
Laurilsulfato de sodio	~40-60%
Dimodan CO-K	~100%

Este ejemplo demuestra que pueden usarse diferentes tensioactivos. En este caso tanto polisorbato 80 como mono y diglicéridos (Dimodan) fueron satisfactorios. El laurilsulfato de sodio no fue tan satisfactorio debido a que este producto químico particular ataca las enzimas.

30

Ejemplo 3

Se trató caldo de fermentación de *Schizochytrium sp.* con antioxidantes (palmitato de ascorbilo y tocoferoles) y se secó en tambor. Entonces se trató ésta biomasa secada tal como sigue:

35

- Se añadió a agua destilada (51 g de biomasa a 300 g de agua)

- Se ajustó el pH al intervalo de 6,9-7,3 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N

40 • Se calentó la mezcla hasta 60°C en un baño de agua

- Se añadieron 1,5 ml de Alcalase® 2.4L FG

45 • Entonces se purgó la mezcla de caldo con nitrógeno para excluir el oxígeno y se incubó a 60°C durante 15 horas

- Se añadieron 120 ml de isopropanol (al 99,9%) con mezclado suave

- Entonces se centrifugó la mezcla de caldo-alcohol a 4000 rpm durante 5 minutos

50 • Se recogió la fase de lípido (sobrenadante)

Se sometió a prueba el lípido recogido para determinar el contenido en anisidina y el índice de peróxido según los métodos de la AOCS (American Oil Chemists' Society) Cd 8-53 y Cd 18-90.

55 También se extrajo con hexano una muestra de la biomasa secada mediante la combinación con hexano y molienda en molino con bolas en un sistema de extracción tubular sueco. Se sometió a prueba el lípido recogido para

## ES 2 391 381 T3

determinar el índice de anisidina y el índice de peróxido como la otra muestra de lípido. Los resultados de prueba del lípido recogido mediante los dos métodos se muestran a continuación:

Muestra	Índice de peróxido	Índice de anisidina
Enzima, método con isopropanol	<0,1	0,8
Extraída con hexano	<0,1	3,0

- 5 Este ejemplo demuestra la lisis satisfactoria de las células con enzimas, el aislamiento del lípido que estuvo presente en las células y la calidad muy alta del lípido (índice de anisidina muy bajo).

La discusión anterior de la invención se ha presentado para fines de ilustración y descripción.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Lípido refinado, blanqueado o desodorizado que comprende ácido graso poliinsaturado, obteniéndose dicho lípido a partir de una planta o microorganismo, teniendo el lípido un índice de anisidina de 1,5 o inferior, habiéndose liberado el lípido a partir de biomasa usando un tratamiento enzimático y comprendiendo el ácido graso poliinsaturado presente en el lípido al menos el 20 por ciento en peso de ácido docosahexaenoico, al menos el 5 por ciento en peso de ácido docosapentaenoico o al menos el 20 por ciento en peso de ácido araquidónico.
- 10 2. Lípido según la reivindicación 1, en el que el índice de anisidina del lípido es de 1 o inferior.
3. Lípido según la reivindicación 1, en el que el índice de anisidina del lípido es de 0,5 o inferior.
4. Lípido según la reivindicación 1, en el que el ácido graso poliinsaturado es ácido docosahexaenoico.
- 15 5. Lípido según la reivindicación 1, en el que el ácido graso poliinsaturado es ácido docosapentaenoico.
6. Lípido según la reivindicación 1, en el que el ácido graso poliinsaturado es ácido araquidónico.
- 20 7. Lípido según la reivindicación 1, en el que el ácido graso poliinsaturado comprende al menos el 30 por ciento en peso de ácido docosahexaenoico.
8. Lípido según la reivindicación 1, en el que el ácido graso poliinsaturado comprende al menos el 35 por ciento en peso de ácido docosahexaenoico.
- 25 9. Lípido según la reivindicación 1, en el que el ácido graso poliinsaturado comprende al menos el 10 por ciento en peso de ácido docosapentaenoico.
- 30 10. Lípido según la reivindicación 1, en el que el ácido graso poliinsaturado comprende al menos el 15 por ciento en peso de ácido docosapentaenoico.
- 35 11. Lípido según la reivindicación 1, en el que el ácido graso poliinsaturado comprende al menos el 20 por ciento en peso de ácido docosapentaenoico.
12. Lípido según la reivindicación 1, en el que el ácido graso poliinsaturado comprende al menos el 30 por ciento en peso de ácido araquidónico.
- 40 13. Lípido según la reivindicación 1, en el que el ácido graso poliinsaturado comprende al menos el 40 por ciento en peso de ácido araquidónico.
- 45 14. Lípido según la reivindicación 1, en el que el ácido graso poliinsaturado comprende al menos el 50 por ciento en peso de ácido araquidónico.
15. Lípido según la reivindicación 1, obteniéndose el lípido a partir de al menos uno del grupo que consiste en algas, bacterias, hongos y protistas.
- 50 16. Lípido según la reivindicación 1, obteniéndose el lípido a partir de algas.
17. Lípido según la reivindicación 1, obteniéndose el lípido a partir de microorganismos seleccionados del grupo que consiste en algas doradas, algas verdes, dinoflagelados, levaduras, hongos del género *Mortierella* y *Stramenopiles*.
- 55 18. Lípido según la reivindicación 1, obteniéndose el lípido a partir de microorganismos seleccionados del grupo que consiste en el género *Mortierella*, el género *Cryptocodinium* y el orden *Thraustochytriales*.
19. Lípido según la reivindicación 1, obteniéndose el lípido a partir de microorganismos seleccionados del grupo que consiste en el género *Thraustochytrium*, el género *Schizochytrium* o mezclas de los mismos.
- 60 20. Lípido según la reivindicación 1, comprendiendo el lípido un monoacilglicérido.
21. Lípido según la reivindicación 1, comprendiendo el lípido un diacilglicérido.
- 65 22. Lípido según la reivindicación 1, comprendiendo el lípido un triacilglicérido.
23. Producto seleccionado del grupo que consiste en un complemento dietético, producto alimenticio, formulación farmacéutica, leche animal humanizada y preparado para lactantes, comprendiendo el producto el lípido según la reivindicación 1.

24. Método de preparación de un producto seleccionado del grupo que consiste en un complemento dietético, producto alimenticio, formulación farmacéutica, leche animal humanizada y preparado para lactantes, que comprende añadir el lípido según la reivindicación 1 al complemento dietético, producto alimenticio, formulación farmacéutica, leche animal humanizada o preparado para lactantes.