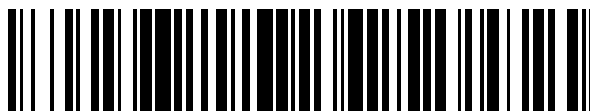


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 477 584**

51 Int. Cl.:

C11B 3/12 (2006.01)

C11B 7/00 (2006.01)

C11C 3/00 (2006.01)

C11C 1/02 (2006.01)

C11C 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2003 E 03776079 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.04.2014 EP 1560803**

54 Título: **Esterificación de aceite marino catalizada por lipasa**

30 Prioridad:

14.11.2002 NO 20025456

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

17.07.2014

73 Titular/es:

PRONOVA BIOPHARMA NORGE AS (100.0%)

P.O. BOX 420

1327 LYSAKER, NO

72 Inventor/es:

HARALDSSON, GUDMUNDUR G.;

HALLDORSSON, ARNAR y

THORSTAD, OLAV

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 477 584 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

Esterificación de aceite marino catalizada por lipasa

Esta invención se refiere a la esterificación de aceites marinos catalizada por lipasa.

5 Se conoce bien en la técnica refinar productos de aceite de diversos tipos, incluyendo aceites marinos, con la ayuda de catalizadores de lipasa cuya especificidad en las condiciones de refinado empleadas potencia la recuperación de un producto deseado.

10 Se ha llevado a cabo una amplia investigación con el fin de desarrollar procedimientos catalizados por lipasa para aislar PUFA importantes comercialmente tales como EPA (ácido eicosapentaenoico, C20:5) y DHA (ácido docosahexaenoico, C22:6) de composiciones tales como aceites de pescado que los contienen en concentraciones relativamente bajas.

15 Por ejemplo, en el documento PCT/NO95/00050 (WO 95/24459) se dio a conocer un procedimiento para tratar una composición de aceite que contenía ácidos grasos saturados e insaturados en forma de triglicéridos para las condiciones de reacción de transesterificación con un alcohol C₁₋₆ tal como etanol en condiciones sustancialmente anhidras en presencia de una lipasa activa para catalizar preferiblemente la transesterificación de los ácidos grasos saturados y monoinsaturados. Con las lipasas preferidas, lipasa de *Pseudomonas* sp. (PSL) y lipasa de *Pseudomonas fluorescens* (PFL) fue posible preparar, a partir de fuentes de aceite marino, concentrados que

Varios procedimientos de refinado catalizados por lipasa han utilizado glicerol.

20 A modo de ejemplo, pueden mencionarse los documentos JP 62-91188 (1987); WO91/16443; Int. J. Food Sci. Technol. (1992), 27, 73-76; Lie y Molin; Myrnes *et al* en JAOCS, Vol. 72, n.º 11 (1995), 1339-1344; Moore *et al* en JAOCS, Vol. 73, n.º 11 (1996), 1409-1414; McNeill *et al* en JAOCS, Vol. 73, n.º 11 (1996), 1403-1407; WO96/37587 y WO96/37587.

25 En el documento PCT/NO00/00056 (WO 00/49117) se proporcionó un procedimiento para esterificar una composición de aceite marino que contenía EPA y DHA como ácidos grasos libres para formar una fracción de ácidos grasos libres enriquecida en al menos uno de estos ácidos grasos en comparación con la composición de partida, que comprendía la etapa de hacer reaccionar dicha composición de aceite marino con glicerol en presencia de un catalizador de lipasa, lipasa de *Rhizomucor miehei* (MML), a presión reducida y condiciones esencialmente libres de disolventes orgánicos, y recuperar una fracción de ácidos grasos libres enriquecida en al menos uno de EPA y DHA. Preferiblemente, se usó destilación de recorrido corto para separar los ácidos grasos libres residuales de la mezcla de glicéridos.

Sin embargo, ahora se ha hecho evidente que esta estrategia basada en destilación de recorrido corto para separar los ácidos grasos libres residuales de la mezcla de glicéridos no es muy factible. Esto se debe a una volatilidad demasiado alta de los monoglicéridos de cadena más corta, que contaminan el destilado en gran medida.

35 Breivik *et al.* (J. Am. Oil Chem. Soc. 74:11 1425-1429 (1997)) describen el uso de lipasa como catalizador para aumentar la concentración tanto de EPA como de DHA. La transesterificación de triglicéridos de aceite de pescado con etanol y una lipasa de *Pseudomonas* como catalizador dio como resultado una fracción de glicéridos residuales enriquecida en EPA y DHA y una fracción de éster etílico con reducción, en una medida similar, de EPA y DHA. Puesto que la diferencia en volatilidad entre las fracciones es grande, la separación se realiza usando destilación de recorrido corto con buenos resultados.

40 El documento WO00/73254 describe un procedimiento para aumentar la concentración de EPA y DHA mediante transesterificación selectiva de una mezcla de éster etílico de ácidos grasos a partir de aceite de pescado en un alcohol mono o polialcoxilado con un catalizador de lipasa dando como resultado una fracción de éster etílico residual enriquecida en EPA y DHA y una fracción de éster alcoxialquílico con reducción de EPA y DHA. Puesto que la diferencia en volatilidad entre las fracciones es grande, la separación usando destilación de recorrido corto se realiza con buen resultado.

45 Haraldsson *et al.* (J. Am. Oil Chem. Soc. 75:11 1551-1556 (1998)) describen diversos usos de lipasas como catalizadores para separar EPA de DHA a partir de aceite de pescado mediante resolución cinética. La transesterificación de triglicéridos de aceite de pescado con etanol y una lipasa de *Rhizomucor miehei* como catalizador dio como resultado una fracción de glicéridos residuales enriquecida en DHA y una fracción de éster etílico enriquecida en EPA. También se describe la esterificación directa de una mezcla de ácidos grasos libres a partir de aceite de pescado con etanol con el mismo catalizador de lipasa y dio como resultado una separación incluso mejor en una fracción de ácidos grasos libres residuales enriquecida en DHA y una fracción de éster etílico enriquecida en EPA. Sin embargo, puesto que no se creyó que fuera posible una separación satisfactoria de ácidos grasos libres de DHA y éster etílico de EPA usando destilación de recorrido corto debido a la pequeña diferencia en volatilidad, y no se disponía de ninguna técnica industrial alternativa, sólo se demostró la separación a escala

analítica (CCF).

Ahora hemos descubierto que los procedimientos catalizados por lipasa para preparar concentrados de EPA y DHA mediante la esterificación directa de ácidos grasos libres con metanol o etanol, o la transesterificación de ésteres alquílicos C_n a partir de aceite de pescado ($n = 2-18$) con alcohol C_m (alcohólisis) ($m=1-12$; $n>m$), y la posterior destilación de recorrido corto proporcionan concentrados ricos en DHA. Estos procedimientos son reacciones rápidas y sencillas que ofrecen separación excelente entre EPA y DHA sin generar monoglicéridos desfavorables en el destilado. Las características esenciales de los procedimientos se definen en las reivindicaciones de patente adjuntas.

En una realización preferida de la invención, el alcohol C_1 - C_{12} es etanol (etanólisis). Entre los ésteres alquílicos C_2 - C_{18} , se prefiere el éster hexílico.

La razón molar de metanol o etanol con respecto a los ácidos grasos libres en el material de partida en la esterificación directa es desde 0,5 hasta 10,0, la razón preferida es desde 0,5 hasta 3,0, y la razón más preferida es desde 1,0 hasta 2,0 o incluso desde 1,0 hasta 1,5.

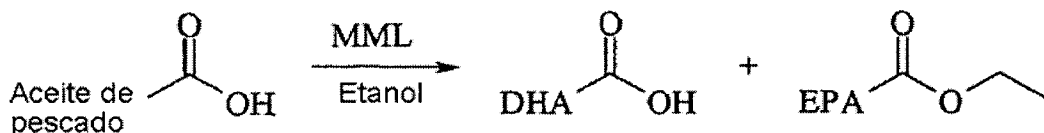
La razón molar de los alcoholes C_m con respecto a ésteres alquílicos C_n en la transesterificación es desde 0,5 hasta 10,0, la razón preferida es desde 0,5 hasta 3,0, y la razón más preferida es desde 2,0 hasta 3,0.

Las esterificaciones se realizan a una temperatura de 0°C a 70°C , y preferiblemente a una temperatura de 20°C a 40°C .

Los catalizadores de lipasa usados en la presente invención se inmovilizan sobre un portador.

Algunas lipasas usadas durante las alcohólisis tienen las propiedades de que catalizan la alcohólisis de DHA a una velocidad muy inferior que la alcohólisis correspondiente de EPA. Una lipasa preferida que tiene tales propiedades es la de *Rhizomucor miehei* (MML). Otras lipasas tienen la propiedad de que catalizan la alcohólisis tanto de EPA como de DHA a una velocidad mucho más lenta que la alcohólisis correspondiente de ácidos grasos más saturados y de cadena más corta. Las lipasas que tienen tales propiedades son la lipasa de *Pseudomonas sp.* (PSL) y la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* (PFL).

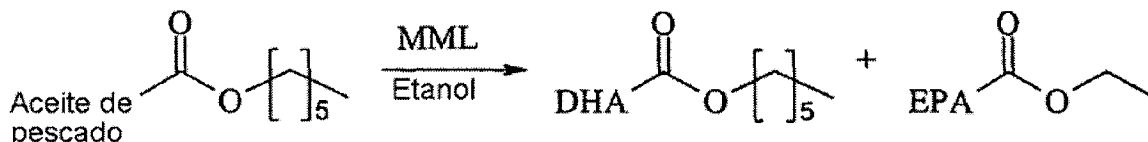
La esterificación directa de ácidos grasos libres de aceite de pescado con etanol mediante MML ya se conoce de G. G. Haraldsson y B. Kristinsson, J. Am. Oil Chem. Soc. 75: 1551-1556(1998).



Esquema 1. Esterificación directa de ácidos grasos libres de aceite de pescado con etanol mediante MML.

Sin embargo, no se creyó que fuera posible una separación satisfactoria de los ácidos grasos libres residuales DHA y ésteres etílicos mediante la técnica de destilación de recorrido corto. Ahora se ha encontrado sorprendentemente que la técnica de destilación de recorrido corto puede usarse de manera altamente satisfactoria. Esto resulta evidente a partir de los resultados mostrados en los ejemplos a continuación.

La presente invención da a conocer además la etanólisis de ésteres hexílicos de aceite de pescado mediante una lipasa, y la destilación molecular posterior para separar ésteres hexílicos residuales y ésteres etílicos más volátiles.



Esquema 2. Etanólisis de ésteres hexílicos de aceite de pescado mediante lipasa (MML).

Para mejorar adicionalmente las recuperaciones de DHA y la concentración en el producto puede usarse una reacción de etanólisis tal como se describe en el documento PCT/NO95/00050 (WO 95/24459) como etapa previa antes de la esterificación directa.

Antes de la esterificación directa, es necesario hidrolizar la mezcla de glicéridos. Para reducir el volumen del material de partida a la mitad antes de la hidrólisis, se encuentra que es útil la reacción de etanólisis del documento PCT/NO95/00050 (WO 95/24459). La presente invención por tanto también da a conocer, como procedimiento alternativo, una reacción de dos etapas enzimáticas comenzando con una etanólisis y una esterificación directa posterior, cada etapa seguida de concentración mediante destilación molecular. Esta reacción de dos etapas también es adecuada para aceites altamente enriquecidos con ácidos grasos monoinsaturados de cadena larga, tal como el aceite de arenque.

La invención se ilustra mediante los ejemplos que siguen.

15 Procedimientos experimentales

Se adquirieron las lipasas bacterianas de *Pseudomonas* sp. (PSL; Lipasa AK) y *Pseudomonas fluorescens* (PFL; Lipasa PS) de Amano Enzyme Inc. Novozyme, de Dinamarca, proporcionó las lipasas inmovilizadas de *Rhizomucor miehei* (MML; Lipozyme RM IM), *Thermomyces lanuginosa* (TLL; Lipozyme TM IM) y *Candida antarctica* (CAL; Novozym 435). Pronova Biocare proporcionó tanto el aceite de sardina (14% de EPA y 15% de DHA), el aceite de anchoa (18% de EPA y 12% de DHA), el aceite de arenque (6% de EPA y 8% de DHA), el aceite de atún (6% de EPA y 23% de DHA), el aceite de hígado de bacalao (9% de EPA y 9% de DHA) como el aceite de bacaladilla (11% de EPA y 7% de DHA).

El análisis de ácidos grasos se realizó empleando un cromatógrafo de gases (CG) Perkin-Elmer 8140 equipado con un detector de ionización de llama (FID). La columna capilar fue la columna capilar de 0,25 μm , DB-225 30 N de 30 metros, de J&W Scientific. La destilación de recorrido corto se llevó a cabo en un alambique Leybold KDL 4. Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se registraron en un espectrómetro de RMN Bruker AC 250 en cloroformo deuterado como disolvente. La cromatografía en capa fina (CCF) preparativa se realizó sobre placas de gel de sílice de Merck (Art 5721). La elución se llevó a cabo con una mezcla 80:20:1 de éter de petróleo:dielil éter:ácido acético. Se usó rodamina G (Merck) para visualizar las bandas que posteriormente se separaron por raspado y se metilaron. Se añadió éster metílico de $\text{C}_{19:0}$ (Sigma) a las muestras como patrones internos antes de la inyección a CG.

Se añadió aceite de pescado (500 g, 0,55 mol) a una disolución de hidróxido de sodio (190 g, 4,75 mol), agua (500 ml) y etanol al 96% (1,7 l). Se dejó la mezcla resultante a reflujo durante 30 minutos (hasta que se observa líquido transparente) y luego se enfrió hasta temperatura ambiente, con agitación constante. Para neutralizar la disolución, se añadió cuidadosamente ácido clorhídrico 6,0 M (870 ml, exceso del 10%) y se transfirió la mezcla resultante a un embudo de decantación. Se extrajeron los ácidos grasos libres dos veces con una mezcla 1:1 de éter de petróleo y dietil éter (1,5 l). Entonces se lavó la fase orgánica tres veces con agua (1,5 l) y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. Se separó por filtración el agente de secado y se eliminaron los disolventes por evaporación, terminando con evaporación a alto vacío durante 2 horas a 50°C. En el análisis en CCF analítica, un único punto indicó ácidos grasos libres puros. El color del producto varió desde amarillento hasta color burdeos oscuro, dependiendo del aceite de pescado.

Se añadió MML inmovilizada (15 g) a una disolución de ácidos grasos libres de aceite de pescado (300 g, aproximadamente 1,03 mol) y etanol absoluto (143 g, 3,10 mol). Se agitó suavemente la suspensión enzimática resultante bajo nitrógeno a 40°C hasta que se alcanzó la conversión deseada. Se tomaron muestras durante la reacción y la cantidad residual de ácidos grasos libres detectada por valoración con NaOH 0,02 M con el fin de monitorizar el progreso de la reacción. Se realizó fraccionamiento mediante CCF preparativa y se cuantificó y se analizó posteriormente cada fracción lipídica en perfil de ácidos grasos mediante CG. Tras alcanzar la conversión deseada, se retiró la enzima mediante filtración y se evaporó el etanol en exceso a vacío. Se obtuvo el concentrado

rico en DHA como residuo tras destilación de recorrido corto de la mezcla resultante.

Etanolisis de aceite de pescado mediante lipasa

- 5 Se añadió MML inmovilizada (20 g) a una disolución de aceite de pescado (400 g, 0,44 mol) y etanol absoluto (61 g, 1,32 mol). Se agitó suavemente la suspensión enzimática resultante bajo nitrógeno a temperatura ambiente hasta que se alcanzó la conversión deseada. Entonces se retiró la enzima mediante filtración y se evaporó el etanol en exceso a vacío antes de la destilación de recorrido corto. Se monitorizó el progreso de la reacción mediante CCF analítica y ^1H -RMN. Se realizó fraccionamiento mediante CCF preparativa y se cuantificó y se analizó posteriormente cada fracción lipídica en perfil de ácidos grasos mediante CG.

Hexanolisis de aceite de pescado mediante lipasa

- 10 Se añadió CAL inmovilizada (25 g) a una disolución de aceite de pescado (500 g, 0,55 mol) y 1-hexanol (338 g, 3,31 mol). Se agitó suavemente la suspensión enzimática resultante bajo nitrógeno a 65°C hasta que los triacilglicerolos se convirtieron completamente en ésteres hexílicos, según CCF analítica y/o ^1H -RMN. Se retiró la enzima mediante filtración y se evaporó el hexanol en exceso a vacío.

Etanolisis de ésteres hexílicos de aceite de pescado mediante lipasa

- 15 Se añadió MML inmovilizada (15 g) a una disolución de ésteres hexílicos de aceite de pescado (300 g, 0,80 mol) y etanol absoluto (111 g, 2,41 mol). Se agitó suavemente la suspensión enzimática resultante bajo nitrógeno a 40°C hasta que se obtuvo la conversión deseada, según ^1H -RMN. Se retiró la enzima mediante filtración y se evaporó el etanol en exceso a vacío. Se obtuvo el concentrado rico en DHA como residuo tras destilación de recorrido corto de la mezcla resultante. Se determinó la composición de ácidos grasos de cada grupo éster mediante ejecución individual en CG.

Ejemplo 1

Esterificación directa de ácidos grasos libres de aceite de pescado con etanol

Aceite de sardina (SO)

- 25 En la tabla 1 se presenta el progreso de la reacción de esterificación directa de ácidos grasos libres de SO, que contienen el 14% de EPA y el 15% de DHA (14/15), con 3 equivalentes de etanol en presencia de MML (5% basándose en el peso de ácidos grasos libres) a 40°C. En estas condiciones, la lipasa presentó actividad extremadamente alta hacia los ácidos grasos libres de SO. Se alcanzó una conversión de más del 70% (% de ésteres etílicos) tras sólo 2 horas. Tras la reacción de 4 horas, los ácidos grasos libres residuales contenían el 49% de DHA y el 6% de EPA en recuperaciones del 73% y 10%, respectivamente.
- 30 y las recuperaciones de DHA, la conversión óptima parece ser una conversión de aproximadamente el 75%. En la tabla 1, se usó el porcentaje en peso de ésteres etílicos producidos durante el progreso de la reacción directamente como medida del grado de conversión.

Tabla 1. Progreso de la reacción de esterificación directa de ácidos grasos de SO (14/15) y etanol mediante MML a 40°C.

Tiempo	Conv. (% mol)	Comp. AG (AGL)		Recuperación	
		% de DHA	% de EPA	% de DHA	% de EPA
1 h	60	32	20	84	56
2 h	71	43	11	80	21
3 h	74	46	7	78	13
4 h	77	49	6	73	10
5 h	78	49	5	69	8
7 h	80	50	5	65	7

- 35 Se obtuvieron resultados excelentes para la esterificación directa de ácidos grasos libres de SO tras la separación mediante destilación de recorrido corto. Se hicieron reaccionar los ácidos grasos libres de SO con etanol en presencia de MML durante 4 horas a 40°C hasta alcanzar una conversión del 78%. Los ácidos grasos libres de la mezcla de reacción comprendían el 49% de DHA y el 6% de EPA con recuperaciones de DHA del 75%. Tras la destilación a 115°C, el residuo comprendía el 69% de DHA y el 9% de EPA en recuperaciones del 65% y el 10%, respectivamente (tabla 2). Se mejoraron las recuperaciones de DHA reduciendo ligeramente la temperatura de destilación (véase la tabla 3). No se pudieron separar todos los ésteres etílicos de los ácidos grasos libres residuales mediante la destilación. Pese a esto, se logró obtener un concentrado rico en DHA de aproximadamente el 90% de ácidos grasos libres y el 10% de ésteres etílicos tras destilación de recorrido corto a 115°C. Los ésteres etílicos obtenidos en el residuo están altamente enriquecidos con DHA como los ácidos grasos libres. Además, los ácidos grasos libres más saturados y de cadena más corta se destilan dando como resultado una concentración superior de DHA del residuo que para la fracción de ácidos grasos libres tras la reacción.

Tabla 2. Resultados de la reacción de esterificación directa de ácidos grasos libres de SO (14/15) y etanol mediante MML a 40°C y separación mediante destilación a 115°C.

Muestra	% en peso	Comp. de ácidos grasos		Recuperación	
		% de DHA	% de EPA	% de DHA	% de EPA
Éster etílico (EE)	78	4	19	25	95
Ácidos grasos libres (AGL)	22	49	6	75	5
Destilado (D) 115°C	85	7	15	35	90
Residuo (R) 115°C	15	69	9	65	10

Los resultados para SO se mejoraron disminuyendo la temperatura de destilación y conversión tal como se presenta en la tabla 3. Tras la reacción de 4 horas se obtuvo una conversión del 75%. Tras la destilación a 111°C, el residuo contenía el 66% de DHA en recuperaciones del 88% con una razón de DHA/EPA de 4,7. A temperatura de destilación ligeramente superior, el residuo comprendía el 74% de DHA en una recuperación del 75% con una razón de DHA/EPA de casi siete. Debe notificarse que la recuperación de DHA tras las destilaciones se basa en el peso en porcentaje de DHA en el aceite de partida.

Tabla 3. Resultados de la reacción de esterificación directa de ácidos grasos libres de SO (14/15) y etanol mediante MML a 40°C y separación mediante destilación a 111 y 113°C.

Muestra	% en peso	Comp. de ácidos grasos		Recuperación	
		% de DHA	% de EPA	% de DHA	% de EPA
EE	75	3	17	23	87
AGL	25	47	7	77	13
D 111°C	79	3	13	12	76
R 111°C	21	66	14	88	24
D 113°C	84	5	15	25	89
R 113°C	16	74	11	75	11

El contenido en etanol puede reducirse hasta 1 equivalente dando como resultado un aumento del tiempo de reacción (tabla 4). También puede introducirse menos lipasa dando como resultado una velocidad de reacción considerablemente inferior.

Tabla 4. Progreso de la reacción de esterificación directa de ácidos grasos de SO (14/15) y 1 equivalente de etanol mediante MML a 40°C.

Tiempo	Conv. (% mol)	Comp. AG (AGL)		Recuperación	
		% de DHA	% de EPA	% de DHA	% de EPA
5 h	71	35	12	80	28
6 h	73	41	11	79	26
7 h	74	44	10	78	24
11 h	77	45	7	76	18

Aceite de anchoa (AO)

En la tabla 5 se presenta el progreso de la reacción de esterificación directa de ácidos grasos libres de AO que comprenden el 18% de EPA y el 12% de DHA (18/12) en condiciones idénticas a las de SO. Como puede observarse, se obtuvo una razón de DHA/EPA de aproximadamente 6:1 a una conversión del 82% tras 24 horas con EPA que comprendía el 8% y el 50% de DHA. La recuperación de DHA fue justo por debajo del 80%. Además, tras 11 horas, a una conversión del 79% se obtuvo una razón de DHA/EPA de 5:1 con recuperaciones de DHA de hasta el 84%. Por tanto, AO y SO son ambos materiales de partida altamente potenciales para obtener concentrados ricos en DHA y también para obtener concentrados ricos en EPA a partir de la fracción de éster etílico si ésta es de interés.

Tabla 5. Progreso de la reacción de esterificación directa de ácidos grasos libres de AO (18/12) y etanol mediante MML a 40°C.

Tiempo	Conv. (% mol)	Comp. AG (AGL)		Recuperación	
		% de DHA	% de EPA	% de DHA	% de EPA
2 h	56	27	29	100	67
5 h	73	37	19	93	27
8 h	76	45	13	90	16
11 h	79	50	9	84	10
24 h	82	50	8	78	8

Los resultados para AO son buenos en lo que se refiere a la concentración de DHA y las razones de DHA/EPA tal como se presenta en la tabla 6. Se hicieron reaccionar los ácidos grasos libres de AO (19/12) como antes hasta

alcanzar una conversión del 76% en 11 horas. Tras la destilación a 121°C, el residuo comprendía el 61% de DHA en una recuperación de sólo el 64%, siendo la razón de DHA/EPA de 5,5. El destilado puede usarse posiblemente para obtener concentrados ricos en EPA mediante una destilación repetida a temperatura inferior. Como ejemplo, se considera que un concentrado del 45% de EPA y el 10% de DHA es una composición deseable para un producto comercial potencial.

Tabla 6. Resultados de la reacción de esterificación directa de ácidos grasos libres de AO (19/12) y etanol mediante MML a 40°C y separación mediante destilación a 121°C.

Muestra	% en peso	Comp. de ácidos grasos		Recuperación	
		% de DHA	% de EPA	% de DHA	% de EPA
EE	76	2	21	10	84
AAG	24	45	13	90	16
D 121°C	87	5	20	36	93
R 121°C	13	61	11	64	7

Aceite de arenque (HO)

Se trataron de manera similar ácidos grasos libres de aceite de arenque que comprenden el 6% de EPA y el 8% de DHA (6/8) en condiciones de esterificación directa tal como se describió anteriormente. En la tabla 7 se presenta el progreso de la reacción. Los ácidos grasos libres residuales, tras la reacción de 12 horas, contenían el 37% de DHA y el 6% de EPA con recuperaciones del 90% y el 18%, respectivamente.

Tabla 7. Progreso de la reacción de esterificación directa de ácidos grasos libres de HO (6/8) y etanol mediante MML a 40°C.

Tiempo	Conv. (% mol)	Comp. AG (AGL)		Recuperación	
		% de DHA	% de EPA	% de DHA	% de EPA
4 h	62	20	12	97	71
6 h	70	24	12	96	61
8 h	74	26	11	96	52
12 h	80	37	6	90	18
24 h	82	37	7	84	10

Se hicieron reaccionar los ácidos grasos libres de diferentes HO que comprendían el 9% de EPA y el 9% de DHA (9/9) durante 12 horas, hasta alcanzar una conversión del 84%, de igual manera que antes. Los ácidos grasos libres de la mezcla de reacción comprendían el 39% de DHA y 8% de EPA con una recuperación del 76% de DHA. Tras la destilación a 110°C, el residuo contenía el 40% de DHA y el 7% de EPA en una recuperación del 68% de DHA con una razón de DHA/EPA de casi 6:1 (tabla 8). La baja concentración de DHA resulta del alto contenido de ácidos grasos monoinsaturados de cadena larga de 20:1 (4%) y 22:1 (37%). Este alto contenido en ácidos grasos monoinsaturados de cadena larga en HO y aceite de capelán les convierte en un material de partida menos factible para el procedimiento descrito. Puede usarse una simple inclusión de urea del aceite residual para retirar la mayor parte de estos ácidos grasos monoinsaturados dando como resultado un concentrado valioso de DHA. Debe añadirse que HO con su bajo contenido en EPA es más adecuado para obtener altas razones de DHA/EPA que SO y AO.

Tabla 8. Resultados de la reacción de esterificación directa de ácidos grasos libres de HO (9/9) y etanol mediante MML a 40°C y separación mediante destilación a 110°C.

Muestra	% en peso	Comp. de ácidos grasos		Recuperación	
		% de DHA	% de EPA	% de DHA	% de EPA
EE	84	2	8	34	76
AAG	16	31	13	66	24
D 110°C	82	4	10	32	88
R 110°C	18	40	7	68	12

Aceite de atún (TO)

En la tabla 9 a continuación se presenta el progreso de la reacción de esterificación directa de ácidos grasos libres de TO que comprenden el 6% de EPA y el 23% de DHA (6/23) en condiciones idénticas a SO descrito anteriormente. Tras una reacción de 8 horas, se obtuvo una conversión del 68%, comprendiendo los ácidos grasos libres residuales el 74% de DHA y el 3% de EPA con una recuperación del 83% de DHA y una razón de DHA/EPA de 25:1 (tabla 9). Claramente, este tipo de composición de EPA/DHA inicial del aceite de partida es ideal para concentrar DHA.

Tabla 9. Progreso de la reacción de esterificación directa de ácidos grasos libres de TO (6/23) y etanol mediante MML a 40°C.

Tiempo	Conv. (% mol)	Comp. AG (AGL)		Recuperación	
		% de DHA	% de EPA	% de DHA	% de EPA
1 h	43	47	9	98	78
2 h	52	69	9	97	65
3 h	62	68	9	96	50
5 h	65	70	6	92	47
8 h	68	74	3	83	14
11 h	70	77	2	78	11
24 h	73	74	2	71	8

Aceite de hígado de bacalao (CLO)

En la tabla 10 se presenta el progreso de la reacción de esterificación directa de ácidos grasos libres de CLO que comprenden el 9% de EPA y el 9% de DHA (9/9) en condiciones similares a las descritas anteriormente. Aproximadamente, se obtuvo una conversión del 79% a una razón de DHA/EPA de 5:1 para los ácidos grasos libres residuales con una concentración del 50% de DHA y una recuperación de más del 80%. Estos resultados son incluso mejores que los de SO y AO considerando recuperaciones de DHA potenciales. Pero en lo que se refiere al coste, SO y AO resultan favorecidos con respecto a CLO. Puede resultar de interés comparar los resultados de CLO (9/9) con los de HO (9/9) a la luz del hecho de que CLO contiene muchos menos ácidos grasos monoinsaturados de cadena larga (20:1 y 22:1).

Tabla 10. Progreso de la reacción de esterificación directa de ácidos grasos libres de CLO (9/9) y etanol mediante MML a 40°C.

Tiempo	Conv. (% mol)	Comp. AG (AGL)		Recuperación	
		% de DHA	% de EPA	% de DHA	% de EPA
2 h	65	37	20	96	62
3 h	71	42	17	94	43
5 h	75	46	13	91	27
8 h	79	48	10	86	17
11 h	80	50	7	76	12
24 h	82	53	5	76	8

Aceite de bacaladilla (BWO)

En la tabla 11 se presenta el progreso de la reacción de esterificación directa de ácidos grasos libres de BWO que comprenden el 11% de EPA y el 7% de DHA (11/7) en las condiciones descritas anteriormente. Con una conversión de aproximadamente el 73%, los ácidos grasos libres residuales comprendían el 24% de DHA en recuperaciones del 95%. EPA no se transfirió a los ésteres etílicos tan rápidamente como se esperaba. Es interesante, y a diferencia de HO, que los ácidos grasos libres monoinsaturados de cadena larga se convertían en un grado mucho mayor en ésteres etílicos. Se necesita una conversión superior para obtener una separación mejor de EPA y DHA. El motivo de la baja conversión para BWO no está claro, pero varios intentos no han dado como resultado una conversión superior.

Tabla 11. Progreso de la reacción de esterificación directa de ácidos grasos libres de BWO (11/7) y etanol mediante MML a 40°C.

Tiempo	Conv. (% mol)	Comp. AG (AGL)		Recuperación	
		% de DHA	% de EPA	% de DHA	% de EPA
4 h	70	22	23	95	51
7 h	71	23	23	95	50
9 h	72	23	23	95	49
24 h	73	24	21	95	44

Ejemplo 2

Etanólisis y esterificación directa combinadas de aceite de pescado

Pudo usarse una reacción de dos etapas, comenzando con una etanólisis y una esterificación directa posterior, seguida cada etapa por destilación molecular, para mejorar las recuperaciones de DHA y la concentración en el producto. Antes de la esterificación directa, es necesario hidrolizar la mezcla de glicéridos obtenida a partir de la etanólisis. Por tanto, la reacción de etanólisis puede usarse como una etapa previa, reduciendo el volumen del material de partida a la mitad antes de la hidrólisis. Deben observarse las altas recuperaciones obtenidas en la etanólisis a 40°C tras la separación mediante destilación (tabla 12). Se obtuvieron mejores resultados a temperatura ambiente tal como se comentó anteriormente y se presentan en las tablas 13 y 14. El residuo de la reacción a temperatura ambiente comprendía el 23% de DHA y el 25% de EPA en recuperaciones del 97% y el 65%, respectivamente (tabla 13). Estos resultados indican que las recuperaciones de DHA pueden mejorarse

significativamente mediante el procedimiento de dos etapas. Además, hay una reducción espectacular en la voluminosidad para la reacción de hidrólisis. Finalmente, este enfoque puede ser adecuado para aceites altamente enriquecidos con ácidos grasos monoinsaturados de cadena larga, tales como HO.

5 Tabla 12. Resultados de la etanolisis y esterificación directa combinadas de AO. Etanolisis de AO (19/12) con etanol mediante MML a 40°C y separación mediante destilación a 125°C, seguido por esterificación directa de los ácidos grasos libres resultantes con etanol mediante MML a 40°C y separación mediante destilación a 115°C.

Muestra	% en peso	Comp. de ácidos grasos		Recuperación	
		% de DHA	% de EPA	% de DHA	% de EPA
D 125°C	41	1	14	3	27
R 125°C	59	18	24	97	73
D 115°C	66	4	22	12	69
R 115°C	34	54	22	88	31

Tabla 13. Resultados de la reacción de etanolisis de AO (18/12) y etanol mediante MML a temperatura ambiente y separación mediante destilación a 125°C.

Muestra	% en peso	Comp. de ácidos grasos		Recuperación	
		% de DHA	% de EPA	% de DHA	% de EPA
D 125°C	47	2	15	3	35
R 125°C	53	23	25	97	65

10 Tabla 14. Resultados de la reacción de etanolisis de AO (18/12) y etanol mediante MML a 40°C y separación mediante destilación a 125°C.

Muestra	% en peso	Comp. de ácidos grasos		Recuperación	
		% de DHA	% de EPA	% de DHA	% de EPA
D 125°C	41	1	14	3	27
R 125°C	59	18	24	97	73

Ejemplo 3

Etanolisis de ésteres hexílicos de aceite de pescado

15 La etanolisis de ésteres hexílicos (HE) a partir de aceite de pescado es una alternativa a la etanolisis de triglicéridos de aceite de pescado descrita anteriormente (esquema 2). Los resultados indican que pueden usarse diversas lipasas, incluyendo la lipasa de *Rhizomucor miehei* (MML) y las lipasas de *Pseudomonas* (PSL y PFL) así como la lipasa de *Thermomyces lanuginosa* (TLL) comercializada recientemente de Novozyme. Además, se ha confirmado que la destilación molecular es bastante adecuada para separar ésteres hexílicos residuales y los ésteres etílicos más volátiles.

20 Se usó la lipasa de *Candida antarctica* (CAL) para convertir triglicéridos de AO en los ésteres hexílicos correspondientes en un tratamiento con hexanol. El tratamiento de los ésteres hexílicos resultantes con etanol y PSL seguido por destilación molecular de la mezcla de reacción puede proporcionar ésteres hexílicos residuales con aproximadamente el 80% de EPA y DHA en una única o en dos etapas de reacción enzimática. Mediante la concentración de DHA en los ésteres hexílicos, no sólo pueden separarse los ésteres etílicos de los ésteres hexílicos, sino además separarse por destilación los ésteres hexílicos más saturados también. Puede ser posible
25 convertir los ésteres hexílicos en ésteres etílicos o bien química o bien enzimáticamente usando CAL. Alternativamente, es posible tratar los ésteres hexílicos de aceite de anchoa en etanolisis usando MML que puede proporcionar el 70% de DHA en una única etapa enzimática como ésteres hexílicos. Pueden concentrarse adicionalmente mediante un tratamiento con MML adicional. A partir del volumen de los ésteres etílicos que contienen la mayor parte de EPA, puede ser posible purificar EPA hasta niveles $\geq 95\%$.

30 Un enfoque de dos etapas alternativo se basa en la etanolisis de aceite de sardina para producir un concentrado de 50% de EPA + DHA (30/20) como una mezcla de glicéridos tras destilación molecular. El tratamiento de los glicéridos residuales con hexanol y CAL proporciona ésteres hexílicos de composición idéntica. Pueden tratarse o bien con etanol y PSL para proporcionar ésteres hexílicos con aproximadamente el 80% de EPA y DHA, o bien con etanol y MML para separar DHA de EPA, seguido por concentración adicional tanto de EPA como de DHA. Este
35 procedimiento puede ser ventajoso porque el volumen de aceite de pescado está tratándose con etanol en lugar de hexanol, que es más fácil de obtener, menos voluminoso y más factible desde el punto de vista industrial. También puede tenerse en cuenta que puede esperarse una recuperación de muy alta a excelente tanto de EPA como de DHA mediante este método.

Aceite de anchoas (AO)

40 Al igual que para la etanolisis de triglicéridos de aceite de pescado, la selectividad de los ácidos grasos y la actividad de MML pueden resultar considerablemente afectadas por la temperatura. Por tanto, puede usarse MML para

concentrar tanto EPA como DHA a o por debajo de 20°C, pero a 40°C EPA se separa de DHA dando como resultado concentrados ricos en DHA. Se hicieron reaccionar ésteres hexílicos de aceite de anchoa que comprendían el 18% de EPA y el 12% de DHA con 2 equivalentes de etanol en presencia de MML (10% en peso de los ésteres hexílicos) durante 24 horas a 40°C hasta alcanzar una conversión del 59%. Tras la retirada del exceso de lipasa, se evaporó el etanol y se destiló la mezcla de éster etílico/éster hexílico (EE/HE) a 135°C a 3×10^{-3} mbar. El residuo (26% en peso) comprendía el 43% de DHA en sólo una recuperación del 65%. La razón de DHA/EPA fue sólo de 2,2 (tabla 15).

Tabla 15. Resultados de la etanólisis de ésteres hexílicos de AO (18/12) y etanol mediante MML a 40°C y separación mediante destilación molecular a 135°C.

Muestra	% en peso ^a	Comp. AG (HE)		Recuperación	
		% de DHA	% de EPA	% de DHA	% de EPA
EE	59	6	18	30	62
HE	41	21	13	70	38
R 135°C	26	43	20	65	28

^aEn las tablas 15 y 16, la conversión de las reacciones catalizadas por lipasa se basa en el porcentaje en moles, mientras que los resultados de destilación se basan en el peso.

Se obtuvieron resultados interesantes cuando la temperatura de reacción se disminuyó hasta 20°C en una reacción similar de ésteres hexílicos de aceite de anchoa (18/13). Tras la destilación a 135°C, el residuo comprendía el 45% de DHA y el 30% de EPA con recuperaciones del 85% y el 55%, respectivamente (tabla 16).

Tabla 16. Resultados de la etanólisis de ésteres hexílicos de AO y etanol mediante MML a 20°C y separación mediante destilación molecular a 135°C.

Muestra	% en peso	Comp. AG (HE)		Recuperación	
		% de DHA	% de EPA	% de DHA	% de EPA
EE	50	1	9	4	26
HE	50	23	25	96	74
R 135°C	32	45	30	87	53

Se sometieron a prueba lipasas de *Pseudomonas* a pequeña escala con buenos resultados, dando una alta recuperación de EPA pero una recuperación considerablemente inferior de DHA, especialmente si la reacción superaba una conversión del 50%. En la tabla 16 se presentan los resultados de la reacción de etanólisis de AO (18/12) con 2 equivalentes de etanol en presencia de PSL y PFL a temperatura ambiente. Para PFL, tras una conversión de sólo el 44% de ésteres hexílicos de aceite de sardina en 24 horas, se obtuvo un contenido del 28% de EPA y el 21% de DHA, mientras que una conversión del 57% para PSL en 24 horas dio el 33% de EPA y el 17% de DHA.

Tabla 17. Resultados de la reacción de etanólisis de ésteres hexílicos de AO (18/12) y etanol mediante PFL y PSL a temperatura ambiente.

Muestra	Conv. (% mol)	Comp. AG (HE)		Recuperación	
		% de DHA	% de EPA	% de DHA	% de EPA
PFL	44	21	28	81	89
PSL	57	17	33	53	79

Se comparó la nueva lipasa de Novozyme (TLL), inmovilizada sobre gel de sílice granular, con MML. Se encontró que la nueva lipasa era sensible a etanol y que la actividad disminuía rápidamente con el aumento de la temperatura. A 20°C, ambas lipasas eran activas y en 24 horas se obtuvo una conversión del 54% para MML, pero sólo del 43% para TLL. Los ésteres hexílicos residuales de TO, que comprendían el 6% de EPA y el 28% de DHA (6/28), a partir de la reacción de TLL, contenían el 8% de EPA y el 45% de DHA. La reacción con MML dio como resultado ésteres hexílicos residuales que contenían el 7% de EPA y el 54% de DHA (tabla 18). Estas lipasas son obviamente similares en la selectividad de los ácidos grasos, pero TLL es más sensible hacia la concentración de etanol, lo que la hace inferior a MML.

Tabla 18. Resultados de la reacción de etanólisis de ésteres hexílicos de TO (6/28) y etanol mediante MML y TLL a temperatura ambiente.

Muestra	Conv. (% mol)	Comp. AG (HE)		Recuperación	
		% de DHA	% de EPA	% de DHA	% de EPA
MML	54	54	7	89	54
TLL	42	45	8	93	77

En la tabla 19 se presentan los resultados de la etanólisis de ésteres hexílicos de TO (6/28) y etanol a 40°C. Es interesante que a 40°C sólo se obtuvo una conversión del 15% para TLL y una conversión del 47% para MML. Se

cree que a temperatura superior, la lipasa se vuelve más sensible para el etanol polar y sus efectos perjudiciales. Para MML, tras una conversión del 47% en 24 horas, los ésteres hexílicos comprendían el 9% de EPA y el 49% de DHA, mientras que una conversión de sólo el 15% para TLL en 24 horas dio el 33% de EPA y el 17% de DHA.

Tabla 19. Resultados de la reacción de etanólisis de ésteres hexílicos de TO (6/28) y etanol mediante MML y TLL a 40°C.

Muestra	Conv. (% mol)	Comp. AG (HE)		Recuperación	
		% de DHA	% de EPA	% de DHA	% de EPA
MML	47	49	9	93	79
TLL	15	30	7	97	95

Mediante la presente invención se obtiene de manera satisfactoria la separación de EPA y DHA mediante esterificación directa libre de disolvente de ácidos grasos libres de aceite de pescado o ésteres hexílicos de aceite de pescado y etanol en presencia de una lipasa. Los problemas con monoglicéridos en el destilado se evitan mediante los procedimientos según la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para separar una fracción de éster etílico o metílico enriquecida en EPA (ácido eicosapentanoico, C20:5) y una fracción de ácidos grasos libres enriquecida en DHA (ácido docosahexanoico, C22:6), que comprende las etapas de una esterificación directa de ácidos grasos libres de aceite de pescado con etanol o metanol en presencia de una lipasa, y separar las fracciones mediante destilación molecular.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el material de partida de ácidos grasos libres de aceite de pescado se obtiene mediante una alcoholólisis catalizada por lipasa de triglicéridos de aceite de pescado, una destilación molecular posterior e hidrólisis de las mezclas de glicéridos residuales.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la razón molar de metanol o etanol con respecto a los ácidos grasos libres en la composición de partida es desde 0,5 hasta 10,0.
4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que la razón molar es desde 0,5 hasta 3,0.
5. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que la razón molar es desde 1,0 hasta 2,0.
6. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que la razón molar es desde 0,5 hasta 1,5.
7. Procedimiento para esterificar una composición de aceite marino que contiene EPA y DHA como ésteres alquílicos C_n de ácidos grasos en el que $n = 2-18$ para formar (1): una fracción de éster alquílico C_n de ácidos grasos en la que $n = 2-18$ enriquecida en DHA en comparación con el material de partida y una fracción de éster alquílico C_m de ácidos grasos en la que $m = 1-12$; $n > m$ enriquecida en EPA en comparación con el material de partida, o (2): una fracción de éster alquílico C_n de ácidos grasos en la que $n = 2-18$ enriquecida tanto en DHA como en EPA en comparación con el material de partida y una fracción de éster alquílico C_m de ácidos grasos en la que $m = 1-12$; $n > m$ inferior tanto en DHA como en EPA en comparación con el material de partida, que comprende la etapa de hacer reaccionar dicha composición de aceite marino con un alcohol C_m en el que $m = 1-12$; $n > m$ en presencia de un catalizador de lipasa en condiciones esencialmente libres de disolventes orgánicos, y separar las fracciones mediante destilación molecular.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el material de partida, éster alquílico C_2-C_{18} , se obtiene mediante una alcoholólisis catalizada por lipasa de triglicéridos de aceite de pescado, una destilación molecular posterior y alcoholólisis de la mezcla de glicéridos residuales con un alcohol alquílico C_2-C_{18} .
9. Procedimiento según la reivindicación 7 y 8, en el que el éster alquílico C_2-C_{18} es éster hexílico.
10. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el alcohol C_1-C_{12} es etanol.
11. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que la razón molar de alcohol C_1-C_{12} con respecto a éster alquílico C_2-C_{18} es desde 0,5 hasta 10,0.
12. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que la razón molar es desde 0,5 hasta 3,0.
13. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que la razón molar es desde 2,0 hasta 3,0.
14. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que dicho catalizador de lipasa es lipasa de *Rhizomucor miehei* (MML), lipasa de *Thermomyces lanuginosa* (TLL), lipasa de *Pseudomonas sp.* (PSL) o lipasa de *Pseudomonas fluorescens* (PFL).
15. Procedimiento según cualquier reivindicación anterior, en el que la reacción de esterificación se realiza a una temperatura de 0°C a 70°C.
16. Procedimiento según la reivindicación 15, en el que la reacción de esterificación se realiza a una temperatura de 20°C a 40°C.
17. Procedimiento según cualquier reivindicación anterior, en el que dicho catalizador de lipasa se inmoviliza sobre un portador.