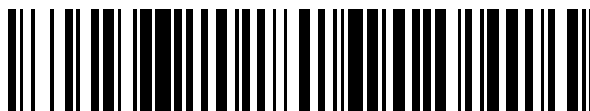


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 509 291**

51 Int. Cl.:

C11B 7/00 (2006.01)

A23D 9/00 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

A61K 31/23 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2002 E 02792720 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.07.2014 EP 1436370**

54 Título: **Procedimiento para producir mezclas de triglicéridos de AGPI nativos con un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados**

30 Prioridad:

19.10.2001 DE 10151155

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

17.10.2014

73 Titular/es:

**LONZA LTD (100.0%)
Münchensteinerstrasse 38
4002 Basel, CH**

72 Inventor/es:

FABRITIUS, DIRK

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 509 291 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

Procedimiento para producir mezclas de triglicéridos de AGPI nativos con un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir mezclas de triglicéridos de AGPI (AGPI = ácidos grasos poliinsaturados) naturales (nativos), enriquecidos con ácidos grasos poliinsaturados, con un contenido mínimo de AGPI > 55 % en peso TFA (contenido total de ácidos grasos; Total Fatty Acids), estando compuestos los mismos en su mayor parte de triglicéridos. Estos se obtienen mediante precipitación en frío (invernización) en uno o varios disolventes orgánicos a partir de aceites de AGPI naturales (nativos) con > 30 % en peso TFA de contenido de AGPI.

Los ácidos grasos altamente insaturados constituyen unos ácidos grasos esenciales para el organismo humano. Los AGPI se pueden dividir en dos grandes grupos. Además del grupo de los AGPI ω -6 que se formula partiendo de ácido linoleico (18:2), existe el grupo de los AGPI ω -3 que se forma partiendo del ácido α -linolénico (18:3). Los AGPI son elementos constituyentes importantes de las membranas celulares, de la retina y de la meninge y son precursores de hormonas importantes, por ejemplo de las prostaglandinas, los tromboxanos y los leucotrienos.

Algunos ejemplos de AGPI importantes para la fisiología alimentaria están representados en la tabla 1:

Tabla 1:

Denominación	Longitud de cadena y número de enlaces dobles C-C	Fuentes más importantes
Ácidos Grasos omega 3		
Ácido α -linolénico (ALA)	C 18:3	Aceite de linaza, aceite de soja, aceite de colza
Ácido estearidónico (SA)	C 18:4	Aceites microbianos
Ácido eicopentaenoico (EPA)	C 20:5	Pescados de mar (caballa, salmón, arenque, sardina, atún)
Ácido docosapentaenoico (DPA)	C 22:5	Pescados de mar (caballa, salmón, arenque), aceites microbianos
Ácido docosahexaenoico (DHA)	C 22:6	Pescados de mar, aceites microbianos (protistas)
Ácidos grasos omega 6		
Ácido γ -linolénico (GLA)	C 18:3	Aceite de onagra, aceite de borraja, grosella negra
Ácido araquidónico	C 20:4	Pescados de mar, aceites microbianos (<i>Mortierella</i>)

Además de la función de elementos constituyentes, en los últimos años se ha podido demostrar que los AGPI tienen directamente múltiples efectos positivos en el organismo humano y en enfermedades.

Una multitud de estudios clínicos han demostrado que los AGPI pueden aportar una contribución importante para la curación o la mitigación por ejemplo en caso de cáncer, artritis reumática, hipertensión y neurodermitis y muchas más enfermedades. Estos conocimientos eran la causa de que instituciones y autoridades internacionales hayan expresado recomendaciones que regulan la cantidad de ingesta diaria de AGPI.

Los AGPI no pueden ser sintetizados de-novo por el hombre, ya que le faltan sistemas enzimáticos capaces de introducir un enlace doble C-C en la cadena de carbono en posiciones >C9 (desaturasa Δ 12 faltante). Sólo mediante la aportación de los llamados ácidos grasos precursores (por ejemplo ácido α -linolénico) a través de la alimentación, el hombre es capaz de sintetizar ácidos grasos poliinsaturados. Sin embargo, existe la controversia de si esta cantidad es suficiente para cubrir la necesidad de ácidos grasos poliinsaturados.

La mayor parte de los ácidos grasos esenciales se ingiere a través de la alimentación. Especialmente los aceites vegetales están enriquecidos con ácidos grasos ω -6 (por ejemplo, la grosella contiene GLA, es decir, ácido gamma-linolénico), pero estos ácidos grasos están representados aquí sólo con una longitud de cadena hasta C18.

Los aceites de pescado contienen ácidos grasos ω -3 (por ejemplo, el aceite de salmón contiene hasta 18 % en peso TFA de EPA y 12 % en peso TFA de DHA). Generalmente, sin embargo, es bajo el contenido del AGPI deseado y está presente en mezcla, pudiendo estar contenidos también AGPI con un efecto antagonista. Especialmente en la alimentación de recién nacidos es indeseable el EPA debido a sus propiedades de inhibición de hemorragias y del crecimiento (M. Hamosh (1998). Longchain polyunsaturated fatty acids: who needs them? Biochem. Soc. Trans., 26(2), 96-103). Los triglicéridos de AGPI altamente concentrados, procedentes de aceites de pescado están sujetos a límites naturales debido a su composición de triglicérido. El contenido total típico de EPA y DHA procedentes de

aceites de pescado se sitúa entre 10 y 25 % en peso TFA.

Por la multitud de ácidos grasos diferentes y, por tanto, también de especies de triglicéridos, las concentraciones máximas alcanzables en AGPI ascienden al 30 % en peso TFA, como máximo.

5 Empleado procedimientos biocatalíticos (uso de lipasas) se logra aumentar la concentración en AGPI en los triglicéridos hasta alrededor de 40 % en peso TFA de DHA (Marinol D40® de la empresa Loders & Crocklaan, Wormerveer, Países Bajos). Sin embargo, no es posible fabricar de esta manera aceites nativos.

10 Un intento de solución similar consiste en la retrosíntesis de triglicéridos de AGPI o lípidos estructurales. Aquí, mediante una lipasa (específica o inespecífica), a partir de AGPI puros se producen triglicéridos de AGPI o lípidos estructurales, de alta pureza (G. G. Haraldsson, B. Ö. Gudmundsson y Ö. Almarsson (1995): The synthesis of homogenous triglycerides of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid by lipase. *Tetrahedron*, 51(3), 941-952, R. Irimescu, K. Hata, Y. Iwasaki y T. Yamene (2001): Comparison of acyl donors for lipase-catalyzed production of 1,3-Dicapryloyl -2-eicosapentaenoylglycerol. *JAOCS*, 78(1), 65-67, F. C. Huang, Y.-H. Ju y J.-C. Chiang (1999): γ -Linolenic acid-rich triacylglycerols derived from borage oil via lipase-catalyzed reactions. *JAOCS*, 76(7), 833-837). Sin embargo, este proceso parece poco conveniente debido al alto precio de los AGPI puros. En estos casos, ya no se trata tampoco de aceites nativos.

20 Por lo tanto, la producción de concentrados de AGPI con un grado de enriquecimiento más elevado (> 30 % en peso TFA de EPA+DHA) en forma de triglicéridos nativos es un reto no solucionado en la actualidad (Haraldsson, G., G. (2000): Enrichment of Lipids with EPA and DHA by lipase. In *Enzymes in Lipid Modification*. Ed. U. Bornscheuer, Wiley VCH).

25 También resulta difícil la producción de mezclas de triglicéridos de AGPI con un mayor grado de concentración a partir de aceites marinos (S.-B. Park, Y. Endo, K. Maruyama y K. Fujimoto (2000): Enzymatic synthesis of ethyl ester of highly unsaturated fatty acids from fish oils using immobilized lipase. *Food Sci. Technol.*, 6(3), 192-195). Mediante complicados procedimientos cromatográficos o destilación de vía corta teóricamente se pueden aislar fracciones de triglicéridos altamente enriquecidos con AGPI, pero durante ellos se producen muchos problemas (W. M. Willis, R. W. Lencki y A. G. Marangoni (1998): Lipid modification strategies in the production of nutritionally functional fats and oils. *Crit. Rev. Food Sci.*, 38(8), 639-674, Hayashi, K. and H. Kishimira (1996): Preparation and purification of DHA-enriched triacylglycerols from fish oils by column chromatography. *Fisheries Science*, 62(5), 842-843). Estos procedimientos son caros y complicados. Además, es indeseable la solubilización térmica de los AGPI lábiles a la oxidación, que conduce a la descomposición de los productos. Por lo tanto, generalmente, estos procedimientos conducen a aceites que ya no son nativos.

40 Por ello, para la producción de concentrados de AGPI no se usan aceites nativos sino mezclas de ácidos grasos o de ésteres que se enriquecen con urea por ejemplo mediante precipitación (S. P. J. N. Senanyake y F. Shahidi (2000): Concentration of docosahexaenoic acid (DHA) from algal oil via urea complexation. *J. of Food Lipids*, 7, 51-61, W. M. N. Ratnayake, B. Olsson, D. Matthews y R. G. Ackmann (1988): Preparation of omega-3 PUFA concentrates from fish oil via urea complexation. *Fat. Sci. Technol.*, 10, 381-386). En estos casos, igualmente es posible elaborar concentrados de AGPI muy puros. Sin embargo, la precipitación con urea no es adecuada para los triglicéridos. Además, la FDA relató una formación de carbamato fisiológicamente crítica (clase de sustancias cancerígenas) durante la precipitación con urea (B. J. Canas (1999): Ethyl carbamate formation during urea complexation for fractionation of fatty acids. *JAOCS*, 76(4), 537).

50 Otros autores relatan reducidos incrementos de la concentración de AGPI y malos rendimientos después de procesos como el fraccionamiento en seco (dry fractionation; sin disolventes) o la cristalización con disolventes (solvent Crystallization; específica con acetona). Bimbo and Crowther consiguen un aumento de la concentración de DHA del 10 % en peso TFA al 11 % en peso TFA y Lee y col. consiguió aumentar la concentración de DHA/EPA del 30,4 % en peso TFA al 35,3 % en peso TFA (A. P. Bimbo y J. B. Crowther (1991): Fish oils: processing beyond crude oil. *Infosh International*, 6, 20-25, K.-T. Lee and T. A. Foglia (2001): Fractionation of menhaden oil and partially hydrogenated menhaden oil: characterization of triacylglycerol fractions. *JAOCS*, 78(3), 297-303).

55 Con una cantidad nominal de una molécula de DHA o de EPA por triglicérido no es practicable aumentar la concentración de AGPI sin usar procedimientos enzimáticos o resíntesis, más allá de una concentración de 300 mg/g de aceite. No es fácil una concentración de EPA o de DHA de 300 mg/g de aceite (Ackmann, R. A. (1988): The year of the fish oils. *Chemistry and Industry*, 7, 139-145). Contenidos más elevadas generalmente se ofertan sólo en forma de los ésteres etílicos o metílicos, aunque en estos casos tampoco se pueden alcanzar contenidos de un AGPI principal superiores al 32,6 % en peso TFA (Moffat, C.F., A. S. McGill, R. Hardy y R. A. Anderson (1993): The production of fish oils enriched in polyunsaturated fatty acid-containing triglycerides. *JAOCS*, 70(2), 133-138). Para ello se usa un procedimiento complicado en forma de una congelación con nitrógeno líquido y la extracción subsiguiente a -60 °C. Según el criterio de los autores, el procedimiento constituye más bien un método para separar triglicéridos sólidos que un método para la producción de triglicéridos de AGPI altamente enriquecidos. El nitrógeno líquido constituye una sustancia peligrosa que no es fácil de emplear en especial técnicamente.

Sólo mediante el uso de microorganismos se consigue la fabricación de aceites de AGPI nativos que contengan concentraciones más elevadas de AGPI que los aceites de pescado o vegetales (K. D. Mukherjee (1999): Production and use of microbial oils. Inform, 10(4), 308-313). De esta manera, estos aceites pueden contener hasta 40 % en peso TFA de DHA, 30 % en peso TFA de GLA o 40 % en peso TFA de ARA.

También para la aplicación en el ámbito alimentario, en el ámbito clínico y en la alimentación de recién nacidos es deseable la administración de triglicéridos nativos, altamente enriquecidos con AGPI, porque se demostró que resulta especialmente preferible la ingesta de AGPI en forma de los triglicéridos (G. G. Haraldsson y A. Thorerensen (1999): Preparation of phospholipids highly enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids by lipase. JAOCS, 76(10), 1143-1149, K. Osada, K. Takahashi y M. Hatano (1990): Hydrolysis and synthesis of icosapentaenoic acid-docosahexaenoic acid rich oil by lipase toyo. J. Jpn. Oil Chem. Soc., 1, 50-52). El uso de ácidos grasos libres en cambio no es adecuado en la alimentación. Estos se refieren especialmente a la alimentación de recién nacidos, ya que los AGPI también están presentes en la leche materna en forma de mezclas de triglicéridos nativos (A. R. Medina, L. E. Cerdan, A. G. Gimenez, B. C. Paez, M. J. I. Gonzalez y E. M. Grima (1999): Lipase-catalyzed esterification of glycerol and polyunsaturated fatty acids from fish and microalgae oils. J. of Biotechnology, 70, 379-391).

Además, supone un problema la cantidad de AGPI que ha de ingerirse diariamente, ya que es necesario ingerir grandes cantidades de aceite (por ejemplo aceites de pescado). Esto se refiere especialmente a aquellos pacientes que tengan que ingerir altas concentraciones de AGPI (por ejemplo en caso de fibrosis quística), ya que al ingerir grandes cantidades de aceite de pescado pueden aparecer efectos secundarios (Y. Kosugi y A. Azuma (1994): Synthesis of triacylglycerols from polyunsaturated fatty acid by immobilized lipase, JAOCS, 71(12), 1397-1403). Para lograr un efecto a ser posible selectivo de los distintos AGPI es preciso emplear AGPI enriquecidos o de alta pureza. Por lo tanto, en el estado de la técnica existe una gran necesidad de triglicéridos nativos altamente enriquecidos con AGPI (Haraldsson, G., G. (2000): Enrichment of Lipids with EPA and DHA by lipase. In Enzymes in Lipid Modification. Ed. U. Bornscheuer, Wiley VCH).

La invernización (precipitación en frío) conocida desde hace mucho tiempo constituye un método con el que se separan aceites de partes sólidas (ceras, alcoholes grasos, triglicéridos saturados) (de Wolf Hamm y Richard. J. Hamilton (2000): Edible oil processing, Chapter 4, Sheffield Academic Press), o para producir aceites con puntos de fusión definidos (S. Hashimoto, T. Nezu, H. Arakawa, T. Ito y S. Maruzeni (2001): Preparation of sharp-melting hard palm midfraction and its use as hard butter in chocolate. JAOCS, 78(5), 455-460). En la práctica, ese procedimiento es el método elegido para producir aceites a partir de grasas.

Yokochi y col. (1990) JAOCS, 67 (11), 846-851, describen una invernización para aumentar la concentración de GLA partiendo de un aceite producido mediante fermentación con *Mortierella ramanniana*. Sin embargo, Yokochi y col. no consiguieron ni de lejos las concentraciones de AGPI que se pueden conseguir con la ayuda de la presente invención. Se consiguieron tan sólo concentraciones del 10,5 % en peso TFA (concentración de partida de GLA 5,7 % en peso TFA). Se usaron en parte disolventes no admitidos por la legislación sobre productos alimenticios (ésteres de petróleo).

El aceite de linaza contiene hasta 62 % en peso TFA de ácido α -linolénico (18:3). No se conoce ninguna otra composición natural en la que esté presente otro AGPI, especialmente DHA y/o EPA, en una concentración tan alta en forma de triglicéridos. Sin embargo, también son especialmente favorables para la salud otros AGPI tales como DHA y/o EPA. Estos AGPI presentan más de 3 enlaces dobles C-C. Otro procedimiento de invernización se dio a conocer por el documento JP59059644.

Por lo tanto, en el estado de la técnica sigue existiendo una necesidad muy grande de este tipo de composiciones que contengan triglicéridos de AGPI nativos en altas concentraciones. Una necesidad especialmente elevada existe para los siguientes AGPI: ácido estearidónico (SA), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosapentaenoico (DPA), ácido docosahexaenoico (DHA), ácido γ -linolénico (GLA) así como ácido araquidónico (ARA). Es particularmente elevada la necesidad de ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido γ -linolénico (GLA).

Ante el estado de la técnica mencionado, la presente invención tenía por tanto el objetivo de proporcionar un procedimiento para obtener mezclas de triglicéridos de AGPI nativos en alta concentración a partir de aceites de AGPI de baja concentración, que permitiera producir preferentemente composiciones (mezclas de triglicéridos de AGPI) que contengan ácido estearidónico (SA), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosapentaenoico (DPA), ácido docosahexaenoico (DHA), ácido γ -linolénico (GLA) así como ácido araquidónico (ARA). De forma especialmente preferible se pretende poder elaborar con el procedimiento según la invención composiciones con un contenido más elevado en ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido γ -linolénico (GLA).

Especialmente, se pretende proporcionar precisamente también composiciones (mezclas de triglicéridos de AGPI) que estén enriquecidas con AGPI con 4 o más enlaces dobles C-C.

Se debe conservar el carácter natural (nativo) de los triglicéridos. El contenido total alcanzable de AGPI debe ser en todo caso > 55 % en peso TFA. Preferentemente, las mezclas de triglicéridos obtenidas deben ser especialmente adecuadas para el uso en el ámbito alimentario o en la farmacología. Por lo tanto, preferentemente, deben usarse sólo disolventes que estén mencionados expresamente en la directiva (88/344/CEE) del Consejo de la Unión Europea del 13 de junio de 1998 y que estén admitidos para el ámbito alimentario. Sin embargo, también pueden resultar adecuados otros disolventes para conseguir este objetivo.

Estos y otros objetivos que no estén mencionados explícitamente, pero que se pueden deducir o concluir sin más de los contextos tratados en la presente introducción, se consiguen mediante un procedimiento según la reivindicación 1. Variantes convenientes del procedimiento según la invención quedan protegidas por las reivindicaciones subordinadas, relacionadas con la reivindicación 1.

El objetivo según la invención se consigue de forma sorprendentemente fácil si

(i) un aceite de AGPI con un contenido de triglicéridos > 85 % en peso y con un contenido de AGPI > 39 % en peso TFA se disuelve en un disolvente orgánico o en una mezcla de disolventes,

(ii) se deja reposar la mezcla durante un tiempo determinado a una temperatura determinada,

(iii) la mezcla se separa en un sobrenadante (producto principal) que contiene las mezclas concentradas de triglicéridos de AGPI y en una fase de sedimento (producto secundario), y

(iv) se vuelve a eliminar el disolvente del producto principal que contiene los triglicéridos de AGPI altamente concentrados.

Para los fines de la presente invención, "mezclas nativas de triglicéridos" significa siempre el producto del procedimiento según la invención. En el procedimiento se emplean siempre como eductos aceites de AGPI nativos.

Para los fines de la presente invención, por aceite de AGPI se entienden: composiciones con un contenido de triglicéridos de al menos el 85 % en peso, preferentemente de al menos el 90 % en peso, de forma especialmente preferible de al menos el 95 % en peso con respecto al peso total de la composición (del aceite de AGPI) y con un contenido total de AGPI > 39 % en peso con respecto a los ácidos grasos totales (TFA). Según la invención, el término aceite abarcará también aquellas mezclas que debido a su consistencia normalmente no se asignan a los aceites, por ejemplo ceras y grasas. Estos aceites de AGPI pueden proceder por ejemplo de microorganismos, o aceites de pescado y aceites vegetales como por ejemplo aceites de AGPI procedentes de *Cryptocodinium*, *Schizochytrium*, *Thraustochytrium*, *Ulkenia* y aceites que contienen AGPI procedentes de *Mortierella* y *Porphyridium*, aceites que contienen AGPI procedentes de *Chlorella*, aceites de AGPI procedentes de colza genéticamente modificada, así como otras composiciones correspondientes. Según la invención, de manera especialmente preferible se emplean aceites microbianos. Resultan igualmente adecuados los aceites procedentes de plantas genéticamente modificadas. Han resultado ser adecuados además los aceites de pescado y aceites vegetales.

Por lo tanto, está claro que según la invención los aceites de AGPI pueden contener además de triglicéridos por ejemplo también pequeñas partes de diglicéridos o ácidos grasos libres, procedentes de fuentes naturales, eventualmente modificadas genéticamente, de forma que siempre hay que partir de que existe una pequeña parte de impurezas. Para los fines de la presente invención no se consideran aceites de AGPI nativos aquellos aceites de AGPI en los que los triglicéridos han sido producidos por ejemplo por resíntesis mediante lipasas.

Por lo tanto, para los fines de la presente invención, nativo significa no producido mediante modificación química o biocatalítica.

A diferencia de los métodos mencionados anteriormente, mediante el procedimiento según la invención se consigue siempre un contenido total de AGPI > 55 % en peso TFA. Mediante este procedimiento se pueden conseguir igualmente contenidos totales en AGPI > 60 % en peso TFA, preferentemente > 70 % en peso TFA, de forma especialmente preferible > 80 % en peso TFA y de forma particularmente preferible > 90 % en peso TFA, que hasta ahora no se alcanzaban. Según la invención, los productos se originan siempre como mezclas nativas de triglicéridos y no como ácidos grasos libres u otros ésteres. Estas mezclas nativas de triglicéridos constituyen por tanto formas de realización preferibles de la presente invención.

Resultan especialmente preferibles las mezclas de concentración más elevada. El contenido total de AGPI significa para los fines de la presente invención la suma de las concentraciones de al menos dos AGPI seleccionados de entre el siguiente grupo: ácido estearidónico (SA), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosapentaenoico (DPA), ácido docosahexaenoico (DHA), ácido γ -linolénico (GLA) así como ácido araquidónico (ARA), y de forma especialmente preferible deben estar contenidos en la mezcla ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido γ -linolénico (GLA).

Por lo tanto, en la composición pueden estar presentes también otros AGPI no mencionados explícitamente. Estos otros AGPI, sin embargo, no se tienen en cuenta al calcular el contenido total de AGPI.

Por lo tanto, dicho contenido total de AGPI se denomina también contenido objetivo en AGPI.

Los disolventes adecuados según la invención son el etanol y la mezcla n-hexano/etanol. Los mejores resultados se lograron con n-hexano/etanol, pudiendo oscilar entre 5:90 y <20:>80 la relación de los porcentajes en volumen de los dos disolventes con respecto a la mezcla, bajo la condición de que la suma de los porcentajes en volumen alcance siempre el valor 100, de forma que este tipo de mezclas de disolventes se emplean de forma particularmente preferible en la presente invención.

La temperatura de la etapa (ii) del procedimiento indicado anteriormente puede variar fuertemente según la mezcla de partida empleada. Resulta favorable el intervalo de -50 °C a -100 °C. Generalmente, resultan favorables especialmente las temperaturas muy bajas, resultando especialmente favorable el intervalo de -85 °C a -100 °C. Evidentemente, se pueden usar también temperaturas aún más bajas, aunque resultan poco rentables generalmente debido al elevado coste energético.

Según la invención, la etapa (ii) se realiza durante al menos 5 minutos pudiendo realizarse durante hasta 18 horas. De manera especialmente preferible, la etapa (ii) se realiza durante 5 a 120 min, de forma aún más preferible durante 10 min a 100 min, y de forma particularmente preferible durante 30 min a 60 min.

Para la separación del producto principal y del producto secundario de la etapa (iii) se pueden emplear la centrifugación, la filtración y la filtración por hielo seco.

Para la separación de la parte de grasa sólida del aceite líquido se puede aplicar cualquier procedimiento de separación habitual que aproveche la distinta densidad de las fases que han de ser separadas. Por ejemplo, aparte de la centrifugación, se puede aplicar también la separación o un decantador. Preferentemente, la centrifugación se realiza con 3.000 a 4.000 g, siendo igualmente adecuados valores de 1.000 a 2.000 g.

Para la filtración se pueden emplear procedimientos de filtración habituales, como por ejemplo filtros de papel, filtros de membrana así como prensas de filtro de membrana con y sin presión.

De manera especialmente preferible, la filtración se realiza a través de un filtro de banda azul sin vacío. Para garantizar una refrigeración suficiente, el filtro se cubre de hielo seco y el material que ha de ser filtrado igualmente se mezcla con dióxido de carbono sólido. De esta manera, se consiguió garantizar una refrigeración a -65 °C. En cualquier caso, se ha de proporcionar una refrigeración suficiente (según el aceite).

Para eliminar los disolventes resulta adecuado cualquier procedimiento habitual para la separación de disolventes al vacío como por ejemplo el uso de evaporadores rotativos, instalaciones de destilación o procedimientos sin vacío, como por ejemplo el soplado de los disolventes con gases inertes.

Bajo otro aspecto de la presente invención, los AGPI especialmente preferibles contienen siempre al menos cuatro enlaces dobles C-C, preferentemente al menos 5, de forma especialmente preferible al menos 6 enlaces dobles C-C.

Lista de abreviaturas

ALA	Ácido alfa-linolénico
ARA	Ácido araquidónico
DHA	Ácido docosahexaenoico
DPA	Ácido docosapentaenoico
EPA	Ácido eicosapentaenoico
GLA	Ácido gamma-linolénico
AGPI	Ácido graso poliinsaturado
SA	Ácido estearidónico
TFA	Contenido total de ácidos grasos (total fatty acids)
p/p	Parte en peso/parte en peso

v/v parte en volumen/parte en volumen

% en peso Porcentaje en peso

5 % en peso Porcentaje en peso TFA referido al contenido total de ácidos grasos (Total Fatty Acids)

Los siguientes ejemplos describen la invención en detalle.

10 **Ejemplo 1: Producción de una mezcla nativa de triglicéridos con un contenido DHA (contenido principal en AGPI) > 55 % en peso TFA y con un contenido total de AGPI de 58 % en peso TFA**

Se usó DHASCO® disponible en el comercio, de la empresa Martek Biosciences Corporation® (Columbia, Maryland, EE.UU.). El contenido de DHA de la mezcla de partida asciende al 45,1 % en peso TFA (indicación del fabricante 42,8 % en peso TFA).

15 1,0 g de aceite se disuelven en 40 ml de n-hexano/etanol (20:80; v:v) (aprox. 2,9 % en peso) y se congelan durante 8 h a -85 °C. A continuación, se centrifuga durante 2 minutos a 0 °C con 3.600 rev./min y se retira el sobrenadante con una pipeta de Pasteur. Una vez eliminados los disolventes en el evaporador rotativo se obtienen 377,1 mg de un aceite claro amarillo. Además, se origina un aceite claro amarillo como residuo (632,7 mg). El análisis por cromatografía de gases arrojó para la fracción de producto un contenido de DHA del 57,5 % y para el residuo un contenido de DHA del 38,2 %. El factor de concentración de DHA es de 1,3.

25 El análisis de los aceites se realiza tras la transesterificación a los ésteres metílicos mediante métodos generalmente conocidos y tras el análisis subsiguiente por cromatografía de gases (Hewlett-Packard GC6890, columna: Macherey & Nagel FFAP Permabond 0,1 µm (25 m, 0,25 mm), funcionamiento Split (10:1), Gas portador: helio (constant flow 1,0 ml/min), funcionamiento FID con hidrógeno (30 ml/min) y oxígeno (300 ml/min) como gases de combustión, make up: 20 ml de helio, temperatura de detector y de inyector: respectivamente 255 °C, programa de temperatura de horno de cromatografía de gases: temperatura inicial 160 °C, fase de parada 12 minutos isotérmica, velocidad de subida de temperatura 10 °C/min hasta la temperatura final de 230 °C, mantener esta durante 5 min, volumen de inyección: 1,0 µl). Mediante la adición de un estándar interno a la mezcla de reacción se puede realizar un análisis cuantitativo.

35 **Ejemplo 2: Producción de una mezcla nativa de triglicéridos con un contenido DHA (contenido principal en AGPI) > 60 % en peso TFA y con un contenido total de AGPI de 79,5 % en peso TFA, no conforme a la invención**

Se usó un aceite producido tal como se describen en Yokochi y col., Appl. Microb. Biotechnol., (1998) 49, págs. 72 a 76. Se cultivó con glicerina como fuente de carbono. El contenido de DHA de la mezcla de partida ascendió al 47,0 % en peso TFA. El contenido de DPA ascendió al 13,4 % en peso TFA.

40 1,0 g de aceite se disuelven en 40 ml de n-hexano/acetona (10:90; v:v) (aprox. 2,8 % en peso) y se congelan durante 3 h a -85 °C. A continuación, se centrifuga durante 2 minutos a 0 °C y a 3.600 rev./min y se retira el sobrenadante con una pipeta de Pasteur. Una vez eliminados los disolventes se obtienen 537,3 mg de un aceite claro amarillo. Además, se origina un aceite turbio amarillo como residuo (472,0 mg). El análisis por cromatografía de gases arrojó para la fracción de producto un contenido de DHA del 64,0 % en peso y para el residuo un contenido de DHA del 34,3 % en peso TFA. El contenido de DPA en la fracción de producto era del 15,5 % en peso TFA. El factor de concentración de DHA es de 1,3.

50 **Ejemplo 3: Producción de una mezcla nativa de triglicéridos con un contenido DHA (contenido principal en AGPI) > 70 % en peso TFA y con un contenido total de AGPI de 85,3 % en peso TFA**

Se usó un aceite producido tal como se describen en Yokochi y col., Appl. Microb. Biotechnol., (1998) 49, págs. 72 a 76. Se cultivó con glicerina como fuente de carbono. El contenido de DHA de la mezcla de partida ascendió al 46,4 % en peso del total de ácidos grasos. El contenido de DPA ascendió al 11,3 % en peso TFA.

55 3,8 g de aceite se disuelven en 100 ml de n-hexano/etanol (10:90; v:v) (aprox. 3,8 % en peso) y se congelan durante 8 h a -85 °C. A continuación, se centrifuga durante 2 minutos a 0 °C y a 3.600 rev./min y se retira el sobrenadante con una pipeta de Pasteur. Una vez eliminados los disolventes se obtienen 174,9 mg de un aceite claro amarillo. Además, se origina un aceite turbio amarillo como residuo (3,62 mg). El análisis por cromatografía de gases arrojó para la fracción de producto un contenido de DHA del 70,1 % en peso y para el residuo un contenido de DHA del 44,4 % en peso TFA. El contenido de DPA en la fracción de producto ascendió al 15,2 % en peso TFA. El factor de purificación para DHA es de 1,5.

Ejemplo 4: Influencia de los disolventes en la concentración del producto

Se usó un aceite producido tal como se describen en Yokochi y col., Appl. Microb. Biotechnol., (1998) 49, págs. 72 a 76. Se cultivó con glicerina como fuente de carbono. El contenido de DHA de la mezcla de partida asciende al 47,0 % en peso del total de ácidos grasos.

1,0 g de aceite se disuelven en 40 ml de los siguientes disolventes: acetona, etanol, isopropanol, n-hexano/etanol (30:70; v:v) (aprox. 2,5 % en peso de aceite con respecto al disolvente) y se congelan durante 17 h a -85 °C. A continuación, se centrifuga durante 2 minutos a 0 °C y a 3.600 rev./min y se retira el sobrenadante con una pipeta de Pasteur. Una vez eliminados los disolventes se obtienen aceites claros amarillos. Además, se origina un aceite turbio amarillo como residuo. Los resultados de los análisis de los sobrenadantes figuran en la tabla 2. Se puede ver claramente que el disolvente empleado tiene una fuerte influencia en el resultado del experimento. En este caso, resultan adecuados como disolvente para producir un aceite DHA al 60 % preferentemente una mezcla de disolventes etanol:n-hexano (70:30, v/v) y, para producir un aceite DHA al 68 %, etanol puro.

Tabla 2: Resultados de los análisis del sobrenadante de las precipitaciones en frío con diferentes disolventes

	Aceite de partida	2,5 % de aceite en acetona	2,5 % de aceite en isopropanol	2,5 % de aceite en etanol según la invención	2,5 % de aceite en etanol/hexano (70:30, v:v)
DHA % área	47,0 %	63,8 %	61,7 %	68,8 %	59,9 %
DHA Rendimiento [%]	100,0 %	67,4 %	11,5 %	17,2 %	78,8 %

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir mezclas concentradas de triglicéridos de AGPI, en el que
- 5 (i) un aceite de AGPI nativo con un contenido de triglicéridos > 85 % en peso con respecto al peso total de la mezcla y con un contenido total de AGPI > 39 % en peso TFA con respecto al contenido total de ácidos grasos se disuelve en un disolvente orgánico o en una mezcla de disolventes orgánicos, empleándose del 1 al 10 % en peso de aceite nativo con respecto al peso del disolvente o de la mezcla de disolventes,
- 10 (ii) se deja reposar la mezcla durante una duración de más de cinco minutos a una temperatura de -50 °C a -100 °C,
- (iii) la mezcla se separa en un sobrenadante (producto principal) que constituye la mezcla concentrada de triglicéridos de AGPI y en una fase de sedimento (producto secundario), y
- (iv) después de separar la fase de sedimento se elimina el disolvente o la mezcla de disolventes del producto principal,
- 15 en el que el disolvente o la mezcla de disolventes se selecciona de entre el grupo constituido por: etanol y mezclas de n-hexano/etanol, pudiendo oscilar entre 5:90 y <20:>80 la relación de los porcentajes en volumen de los dos disolventes con respecto a la mezcla,
- 20 bajo la condición de que la suma de los porcentajes en volumen alcance siempre el valor 100, y en el que la mezcla concentrada de triglicéridos de AGPI comprende restos de ácido docosahexaenoico (DHA).
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la duración de la etapa (ii) es de 5 a 120 min.
3. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que la temperatura de la etapa (ii) es de -85 °C a -100 °C.
- 25 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que la separación de la etapa (iii) se realiza mediante centrifugación.
- 30 5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que la centrifugación se realiza durante 2 a 60 minutos a >1000 g.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que la separación de la etapa (iii) se realiza mediante filtración.
- 35 7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que la filtración se realiza sobre hielo seco a una temperatura inferior a -60 °C.
- 40 8. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que como aceite de AGPI se selecciona una mezcla de entre el grupo constituido por: aceites de AGPI nativos de microorganismos, aceites de pescado y aceites vegetales.