

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 619 163**

51 Int. Cl.:

C07J 9/00	(2006.01)
C11B 7/00	(2006.01)
C11C 3/00	(2006.01)
C12P 7/64	(2006.01)
A23D 9/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.01.2003 PCT/IL2003/00081**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.08.2003 WO03064444**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2003 E 03734819 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.12.2016 EP 1472270**

54 Título: **Fraccionamiento de ésteres de fitosterol en aceite**

30 Prioridad:

31.01.2002 IL 14794202

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.06.2017

73 Titular/es:

**ENZYMOTEC LTD. (100.0%)
Sagi 2000 Industrial Park
36584 Kfar Baruch, IL**

72 Inventor/es:

**GAKO-GOLAN, EINAV;
BASHEER, SOBHI;
PLAT, DORIT;
BEN-DROR, GAI;
FARKASH, ORLY;
HOTAM, ELZAPHAN y
GOLDSHMIT, ZOHAR**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 619 163 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

Fraccionamiento de ésteres de fitosterol en aceite

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a composiciones de materia que comprenden diacilglicerol(es) (DAG), principalmente 1,3-diacilglicerol(es), y ésteres de fitosterol y / o fitostanol (PSE) y opcionalmente monoglicéridos, disueltos o dispersos en aceite de pescado comestible, a su preparación y usos diversos, particularmente como nutrientes dietéticos, como complementos alimenticios y / o como ingredientes en la industria alimentaria.

10 Más específicamente, La presente invención se refiere a productos de alcoholisis, esterificación y / o interesterificación de fitosterol(es) y / o fitosterol(es) en aceite utilizando una lipasa, opcionalmente revestida con tensioactivo, . En particular la invención se refiere a nuevas mezclas de éster(es) de fitosterol y / o fitostanol en aceite de pescado comestible. Dichas mezclas generalmente comprenden una fracción oleosa que contiene, , *entre otras cosas*, diacilglicerol(es) y ésteres de fitosterol y / o fitostanol de ácidos grasos principalmente insaturados, y una fracción de tipo pasta que contiene diacilglicerol(es) y ésteres de fitosterol y / o fitostanol de ácidos grasos principalmente insaturados. La presente invención también proporciona diversas nuevas mezclas enriquecidas de diglicérido(s) y ésteres de fitosterol y / o fitostanol en aceite de pescado, obtenidas por fraccionamiento adicional de las mezclas de la invención. La presente invención se refiere además a ésteres de fitosterol y / o ésteres de fitostanol altamente purificados y mezclas de ésteres obtenidos mediante dicho procedimiento de fraccionamiento.

Antecedentes de la invención

20 El término "fitosteroles" abarca los esteroides vegetales y los estanoles vegetales. Los esteroides vegetales son sustancias de origen natural presentes en la dieta como componentes minoritarios de los aceites vegetales. Los esteroides vegetales tienen un papel en las plantas similar al del colesterol en los mamíferos, por ejemplo, formando estructuras de membrana celular. En la nutrición humana, tanto los esteroides vegetales libres como los estanoles vegetales libres son beneficiosos.

25 Los fitosteroides y los ésteres de fitosteroides se utilizan actualmente en tres categorías industriales principales, es decir productos farmacéuticos, cosméticos y alimentarios. En la nutrición humana, se ha demostrado que los fitosteroides reducen el colesterol sérico y, por tanto, reducen el riesgo de enfermedades cardiovasculares (ECV) [Pollak, O.J. (1953) *Circulation*, 7, 702-706]. Dado que los fitosteroides no son solubles en grasa, se desarrollaron procedimientos de esterificación para producir ésteres de fitosterol liposolubles. Los alimentos comunes disponibles que contienen ésteres de fitosterol son principalmente aceites, margarinas y hasta cierto punto productos lácteos. Muchos otros productos alimenticios actuales contienen ésteres de fitosterol, , *entre otras cosas*, pasta y productos de chocolate, por nombrar solo algunos. La incorporación de ésteres de fitosterol en productos alimenticios parece ser importante y proporciona fácilmente alternativas dietéticas para la terapia preventiva de la reducción del colesterol sérico en una población normal en el caso de colesterolemia preliminar y, en combinación con estatinas, en la hipercolesterolemia grave.

35 *Diglicéridos (DAG)*

Los diglicéridos contienen solo dos ácidos grasos por molécula de grasa, en lugar de tres. La mayor parte de los dos ácidos grasos se localizan principalmente en cada extremo de la molécula de grasa (generalmente en referencia a 1,3 posiciones). En nutrición, esta composición de diglicéridos con la posición única de ácidos grasos es de diferencia significativa. El cuerpo digiere el aceite de DAG igual que un aceite convencional. Sin embargo, uno de los componentes de la digestión es diferente, debido a la posición original de los dos ácidos grasos en el aceite DAG. El intestino no prefiere reensamblar las partículas ricas en grasa utilizando este componente de la digestión, y esto se refleja en un menor número de partículas ricas en grasa en la sangre después de una comida que contiene aceite de DAG. Como resultado, el componente de la digestión está completamente desmontado en el intestino. Esta diferencia lleva al cuerpo a utilizar esta porción de los ácidos grasos para la energía en lugar de almacenamiento de grasa después de la absorción. Un estudio adicional del aceite de DAG en seres humanos demostró que después del consumo de tan solo 20 gramos de aceite de DAG, se observó que el número de partículas ricas en grasa en la sangre disminuía en comparación con el aceite convencional (Taguchi, H., et al., *J Am Coll Nutr* (2000 Nov-Dec) 19(6):789-96). El nivel de partículas ricas en grasa después del consumo de aceite de DAG es aproximadamente un 50 % menor que el aceite convencional al nivel máximo de partículas ricas en grasa después de una comida. A medida que los investigadores comprenden el impacto de los niveles de grasa después de las comidas sobre la salud de los vasos sanguíneos, este aspecto del aceite DAG podría ser aún más beneficioso. En personas con un peso corporal, y un índice de masa corporal (IMC) particularmente altos, el consumo a largo plazo de aceite de DAG puede afectar el peso corporal y a los cambios de grasa corporal. En los estudios iniciales se indica que el peso corporal y las pérdidas de grasa corporal pueden producirse en mayor medida cuando se consumen 10-25 gramos de aceite de DAG al día en lugar de aceite convencional (Nagao, T., et al., *J Nutr* (2000) 130(4):792-7). El aceite de DAG ha sido aprobado por el gobierno japonés para los usos específicos de salud referentes a los lípidos en sangre después de una comida y al peso corporal. Además, una asociación profesional de médicos japoneses ha recomendado oficialmente aceite de DAG como parte de una dieta saludable. En Estados Unidos, El aceite de DAG es generalmente reconocido como

seguro (GRAS) por un panel de expertos y puede ser comercializado como aceite de cocina y propagarse. En un estudio inicial se indica que el peso corporal y los cambios en la masa grasa total pueden responder de la misma manera beneficiosa en individuos americanos adultos con sobrepeso (FASEB J (2001) 15 (4): A301) y en individuos japoneses.

- 5 En el documento WO01/32035 se instruye sobre productos basados en aceite de oliva, basados en grados especialmente altos de aceites de oliva (tales como aceites de oliva vírgenes), que comprenden ésteres de estanoles vegetales y / o ésteres de esteroides vegetales.

10 En la patente de Estados Unidos N.º 5.843.499 se divulga aceite extraíble a partir de fibra de maíz que contiene ésteres ferulados (ésteres de fitosteroides que están esterificados en ácido ferúlico), en particular éster sitostanílico, que se ha demostrado que tiene actividad hipocolesterolemizante. Se menciona que el aceite de fibra de maíz (que contiene aproximadamente 73 % de grasa (triacilglicerol), 8 % de ésteres de esteroides (ácido graso), 4 % de esteroides libres, 6 % de diacilglicérol y 6 % de ferulados (ésteres de esteroides) se utiliza como aditivo para alimentos suplementarios para reducir el nivel de colesterol.

15 La Patente de Estados Unidos N.º 6.326.050 divulga una composición que consiste en aceite o grasa, un diacilglicerol, un fitosterol libre y tocoferol, disueltos o dispersos en el aceite o la grasa.

Ninguna de las publicaciones mencionadas anteriormente ha descrito una combinación de éster de fitosterol y diacilglicerol en aceite y / o grasa.

Adicionalmente, la técnica anterior no describe el enriquecimiento de ningún aceite o grasa de origen natural con diglicéridos y ésteres de fitosterol o fitostanol.

20 El documento WO01 / 75083 describe un procedimiento para la alcoholisis o la esterificación selectivas (interesterificación) de esteroides libres (incluyendo fitosteroides) en un producto a base de grasa, utilizando una lipasa inmovilizada, opcionalmente revestida con tensioactivo. La reacción tiene lugar en presencia de triglicéridos contenidos en el producto a base de grasa, opcionalmente después de la adición de al menos un ácido graso carboxílico o derivado de éster del mismo. Como se ha definido en la presente publicación, "alcoholisis selectiva"
25 significa que el procedimiento provoca alcoholisis o esterificación del esteroide libre, sin causar un cambio significativo en la identidad o distribución posicional de los grupos ácido grasos en el esqueleto de glicerol de los triglicéridos presentes en el producto a base de aceite o grasa, por ejemplo, grasa de la leche. Esta publicación describe composiciones de grasa de la leche modificadas y preparaciones alimenticias con niveles bajos de colesterol obtenidas por el procedimiento descrito, y describe además los productos a base de grasa obtenidos *in situ* enriquecidos con ésteres
30 de fitosterol. Sin embargo, El documento WO 01/75083 no proporciona ningún detalle sobre la composición y los constituyentes de los productos obtenidos mediante dicha reacción de esterificación selectiva o sus propiedades físicas, ni tampoco enseña o sugiere etapas de enriquecimiento específicas de los productos obtenidos, para usos mejorados de las combinaciones obtenidas de diacilglicerol(es) y ésteres de fitosterol y / o fitostanol o los productos enriquecidos correspondientes.

35 El documento WO 00/73407 A se refiere a composiciones de grasas que contienen esteroides vegetales y a un procedimiento para producir las mismas. Estas composiciones son capaces de proporcionar un efecto inhibitorio de la absorción de colesterol. Las composiciones divulgadas en el documento WO 00/73407 comprenden un éster de ácido graso de esteroide vegetal y de 10 a 70 % en peso de un glicérido parcial.

40 En vista de lo anterior, es un objeto de la presente invención proporcionar una composición comestible que consiste en éster(es) de fitosterol y / o éster(s) de fitostanol y diacilglicerol(es) en aceite de pescado, que puede comprender adicionalmente opcionalmente monoglicéridos.

Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar dicha composición como suplemento nutricional dietético (aditivo alimentario) o como ingrediente en productos alimentarios.

45 Es aún un objeto adicional de la presente invención preparar dicha composición por interesterificación enzimática de fitosterol (es) y / o fitostanol (es), en la que los triglicéridos contenidos en el aceite de pescado sirven como donantes de ácido, o simplemente mezclando o combinando éster(es) de fitosterol y / o fitostanol y diacilglicerol(es) con el aceite de pescado.

Otro objeto más de la presente invención es proporcionar una mezcla de diacilglicérido(s) y éster(es) de fitosterol y / o fitostanol en aceite de pescado, que puede fraccionarse adicionalmente para un mayor enriquecimiento.

50 Es otro objeto más de la presente invención proporcionar diversas mezclas enriquecidas de diacilglicérido(s) y éster(es) de fitosterol y / o fitostanol de ácidos grasos saturados.

Es otro objeto más de la presente invención proporcionar diversas mezclas enriquecidas de diacilglicérido(s) y éster(es) de fitosterol y / o fitostanol de ácidos grasos insaturados.

Es otro objeto más de la presente invención proporcionar ésteres de fitosterol y / o fitostanol altamente purificados.

Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar un procedimiento para preparar una composición que consiste en éster(es) de fitosterol y / o fitostanol, y diglicéridos, de la composición predeterminada, en aceite de pescado.

Estos y otros objetos de la invención serán evidentes a medida que progresa la descripción.

5 **Sumario de la invención**

La invención se refiere a una composición de materia según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende al menos un diacilglicerol que son principalmente 1,3-diacilglicerol(es) y al menos un éster de fitosterol y / o fitostanol disuelto o disperso en un aceite de pescado comestible.

10 La composición de materia de acuerdo con la invención comprende, preferiblemente, de 1 a 99 % en peso de diacilglicerol y de 1 a 99 % en peso de ésteres de fitosterol y / o fitostanol disueltos o dispersos en aceite de pescado comestible, y puede comprender adicionalmente opcionalmente monoglicéridos.

15 En realizaciones particulares, la composición de materia de acuerdo con la invención comprende de 1 a 99 % en peso de diacilgliceroles, de 1 a 99 % en peso de ésteres de fitosterol y / o fitostanol y de 0 a 50 % en peso de monoglicéridos y de 1 a 99 % en peso de triacilglicerol(es). Más en particular, la composición de materia de acuerdo con la invención comprende de 3 a 50 % en peso de diacilgliceroles, de 7 a 48 % en peso de ésteres de fitosterol y / o fitostanol y de 2 a 90 % en peso de triacilglicerol(es).

Los ésteres de fitosterol se pueden seleccionar del grupo constituido por ésteres de beta-sitosterol, campesterol, estigmasterol y brassicasterol. Los ésteres de fitostanol se pueden seleccionar del grupo constituido por ésteres de estigmasterol, campestanol y sitostanol.

20 En realizaciones particulares, dichos ésteres de fitosterol y / o fitostanol son ésteres de ácidos grasos C₁₄-C₂₂, preferentemente C₁₆-C₁₈, saturados o insaturados, en particular ácidos oleico, linoleico, linolénico, palmítico y esteárico.

El (los) diacilglicerol(es) son, preferiblemente, 1,3-diacilglicerol(es) grasos.

25 En una realización adicional, la invención se refiere a un suplemento alimentario dietético y a productos alimentarios que comprenden la composición de materia de acuerdo con la invención.

30 En una realización adicional más, la invención proporciona un procedimiento para fabricar una composición de materia acuerdo con la invención, cuyo procedimiento comprende la etapa de esterificar el (los) fitosterol(es) y / o el (los) fitostanol(es) en aceite de pescado para dar un producto (denominado Mezcla A) que consiste en ésteres de fitosterol y / o fitostanol y diglicéridos en aceite de pescado, en el que dicho producto comprende dos fracciones visiblemente distintas que son una fracción de aceite que comprende diacilglicerol(es), triacilglicerol(es) y ésteres de fitosterol y / o fitostanol de ácidos grasos principalmente insaturados y una fracción de tipo pasta que comprende diacilglicerol(es), triacilglicerol(es) y ésteres de fitosterol y / o fitostanol de ácido(s) graso(s) principalmente saturados.

35 En el procedimiento de la invención, dicha fracción de aceite contiene aproximadamente 10-20 % en peso de ésteres de fitosterol y / o fitostanol de ácido(s) graso(s) principalmente insaturados y dicha fracción de tipo pasta contiene aproximadamente 30-35 % en peso de ésteres de fitosterol y / o fitostanol de ácido(s) graso(s) principalmente saturados. Los ésteres de fitosterol y / o fitostanol empleados en el procedimiento de la invención son ésteres de ácidos grasos C₁₄-C₂₂, preferentemente C₁₆-C₁₈, saturados o insaturados, en particular ácidos oleico, linoleico, linolénico, palmítico y esteárico. Los fitosteroles particulares se seleccionan del grupo que consiste en beta-sitosterol, campesterol, estigmasterol, brassicasterol, y los fitosteroles particulares se seleccionan del grupo que consiste en sitostanol.

40 En otra realización, la invención se refiere a un procedimiento para obtener un producto que contiene ésteres de fitosteroles y / o fitostanoles con ácidos grasos saturados o insaturados, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de (a) esterificar fitosterol(s) y / o fitostanoles en aceite de pescado, para dar un primer producto (denominado Mezcla A), comprendiendo dicho primer producto dos fracciones visiblemente distintas, siendo la primera fracción una fracción oleosa que comprende diacilglicerol(es), diacilglicerol(es) y ésteres de fitosterol y / o fitostanol de ácidos grasos principalmente insaturados, y siendo la segunda fracción una fracción de tipo pasta que comprende diacilglicerol(es), diacilglicerol(es) y ésteres de fitosterol y / o fitostanol de ácidos grasos principalmente insaturados, y (b) separar las dos fracciones de dicha Mezcla A, para dar un primer producto (denominado Mezcla B) que comprende diacilglicerol(es), triacilglicerol(es) y éster(es) de fitosterol y / o fitostanol de ácidos grasos principalmente saturados y un segundo producto (denominado Mezcla C) que comprende diacilglicerol(es), triacilglicerol(es) y éster(es) de fitosterol y / o fitostanol de ácido(s) graso(s) principalmente insaturados.

La separación de las dos fracciones de la Mezcla A se puede llevar a cabo por centrifugación.

El contenido de ésteres de fitosterol y / o fitostanol en la Mezcla B puede enriquecerse adicionalmente para formar un producto (denominado Mezcla B1) que comprende al menos 50 % en peso de ésteres de fitosterol y / o fitostanol de

ácidos grasos principalmente saturados. Por tanto, la mezcla B puede enriquecerse mediante tratamiento con hexano, o puede enriquecerse mediante tratamiento con tolueno, para dar ésteres de fitosterol y / o fitostanol sustancialmente puros (al menos 98 % en peso) de ácidos grasos principalmente saturados (denominados Mezcla B2).

5 El contenido de ésteres de fitosterol y / o fitostanol en la Mezcla C puede enriquecerse adicionalmente para formar un producto (denominado Mezcla C1) que comprende al menos 25 % en peso de ésteres de fitosterol y / o fitostanol de ácidos grasos principalmente insaturados. Por tanto, la mezcla C puede enriquecerse mediante tratamiento con acetona, o mediante tratamiento con tolueno, para dar ésteres de fitosterol y / o fitostanol puros (al menos 95 % en peso) de ácidos grasos principalmente insaturados (denominados Mezcla C2).

10 Todavía además, la invención se refiere a un nutriente dietético, producto alimenticio o suplemento alimenticio según la reivindicación 12 o las reivindicaciones 24 a 26, que comprende diacilglicerol(es), triacilglicerol(es) y éster(es) de fitosterol y / o fitostanol de ácido(s) graso(s) principalmente insaturados y/o ácido(s) graso(s) principalmente saturados. El nutriente dietético, producto alimenticio o suplemento alimenticio, pueden comprender además monoglicéridos.

La invención también se refiere a dicho nutriente dietético, producto alimenticio o suplemento alimenticio, en forma de unidad de dosificación, preferiblemente un comprimido o cápsula.

15 El nutriente dietético o producto alimenticio de acuerdo con la invención puede ser uno cualquiera de mantequilla baja en colesterol, manteca de cacao, grasa de leche anhidra, helado, blanqueador de café y crema, producto lácteo, particularmente queso y otros alimentos que contienen colesterol.

Breve descripción de las figuras

20 La presente invención se comprenderá más claramente a partir de la descripción detallada de las realizaciones preferidas y de los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1 representa el cromatograma de gas de la Mezcla B obtenido por alcoholisis de estigmasterol en aceite de canola.

La figura 2 representa el cromatograma de gas de la Mezcla C obtenido por alcoholisis de estigmasterol en aceite de canola.

25 La figura 3 representa el cromatograma de gas de la Mezcla A, tomada a 60 °C, después de la esterificación de fitosteroles en aceite de girasol.

La figura 4 representa el cromatograma de gas de la Mezcla B que se obtuvo a partir de la Mezcla A de la Figura 3.

La figura 5 representa el cromatograma de gas de la Mezcla C que se obtuvo a partir de la Mezcla A de la Figura 3.

30 La figura 6 representa el cromatograma de gas de la Mezcla C1 que se obtuvo a partir de la Mezcla C de la Figura 5.

La figura 7 representa el cromatograma de gas de la Mezcla C2 que se obtuvo a partir de la Mezcla C de la Figura 5.

La figura 8 representa el cromatograma de gas de la Mezcla B1 que se obtuvo a partir de la Mezcla B de la Figura 3.

35 La figura 9 representa el cromatograma de gas de la Mezcla B2 que se obtuvo a partir de la Mezcla B de la Figura 3.

Descripción detallada de la invención

40 En busca de un suplemento alimentario aún más beneficioso, Los inventores han llegado sorprendentemente a una combinación de diacilglicerol(es), Principalmente 1,3-diacilglicerol(es) (DAG) y ésteres de fitosterol y / o de fitostanol (PSE) en aceite de pescado, que es un objeto de la presente invención. Si bien se conocían diversas combinaciones de fitosteroles y diglicéridos (por ejemplo, dicha patente de EE.UU. 6.326.050), La combinación de ésteres de fitosterol y diacilglicerol (es) disueltos o dispersados en aceite de pescado es novedosa, y se encontró inesperadamente que tenía varias ventajas sobre las combinaciones conocidas de diacilglicerol (es) y fitosterol libre. Por tanto, usando ésteres de fitosterol en lugar de los fitosteroles libres convencionales, es más fácil aumentar su concentración en la mezcla. Además, los esteroleos vegetales cristalinos no se disuelven en grado significativo en la fase micelial del canal alimentario, y, por lo tanto, no son capaces de inhibir eficazmente la absorción de colesterol. Por otra parte, el aceite de pescado es solo en un grado limitado capaz de disolver esteroleos libres. Solamente en forma disuelta los esteroleos inhiben la absorción del colesterol.

50 Por tanto, la característica principal de la presente invención es una composición que consiste esencialmente en diacilglicerol (es) y éster(es) de fitosterol y / o fitostanol disueltos o dispersos en aceite de pescado comestible. La composición de la presente invención puede ser útil como nutriente dietético, como complemento alimentario y / o como ingrediente en la industria alimentaria.

55 Las composiciones de la invención pueden obtenerse, por ejemplo, utilizando el procedimiento de alcoholisis selectiva o (inter)-esterificación descrito en el documento WO01 / 75083. Se ha encontrado ahora que el producto de aceite que puede obtenerse mediante la esterificación selectiva de fitosterol tal como se describe en el documento WO 01/75083 o un procedimiento similar, consiste en dos fracciones, cada uno de los cuales contiene diglicérido(s) y un tipo diferente de éster(es) de fitosterol y / o fitostanol. Más en particular, el producto de la alcoholisis selectiva o

interesterificación es una mezcla constituida por dos fracciones (aceite y pasta), en la que el (los) éster(es) de fitosterol y / o fitostanol de ácidos grasos saturados están sustancialmente contenidos en una fracción, mientras que los ésteres de ácidos grasos insaturados están sustancialmente contenidos en la otra fracción.

5 Por tanto, la presente invención proporciona además un procedimiento para preparar dicha composición, en la que el procedimiento comprende una etapa de esterificación de fitosterol (es) y / o fitostanol (es) en aceite de pescado, para producir un producto (denominado Mezcla A) que consiste en ésteres de fitosterol y / o fitostanol y diglicéridos en dicho aceite de pescado. Este producto comprende dos fracciones (capas) visiblemente distintas, a saber, una fracción oleosa que contiene diglicéridos, triglicéridos y ésteres de fitosterol y / o fitostanol de ácido(s) graso(s) principalmente insaturados, y una fracción de tipo pasta (dispersión) que contiene diglicéridos, triglicéridos y ésteres de fitosterol y / o fitostanol de ácido(s) graso(s) principalmente insaturados. Las dos fracciones se separan para dar un producto (denominado Mezcla B) que comprende diglicéridos, triglicéridos y ésteres de fitosterol y / o fitostanol de ácidos grasos principalmente saturados y un segundo producto (denominado Mezcla C) que comprende diglicéridos, triglicéridos y ésteres de fitosterol y / o fitostanol de ácidos grasos principalmente insaturados.

15 Adicionalmente de acuerdo con la invención, el contenido de ésteres de fitosterol y / o fitostanol en las Mezclas B y C puede enriquecerse opcionalmente adicionalmente. De manera importante, la presente invención permite el enriquecimiento de cualquier aceite de origen natural con ésteres de esteroides y diacilgliceroides.

Dichas mezclas B y C pueden someterse a otras etapas de enriquecimiento de los ésteres de fitosterol y / o fitostanol contenidos en cada capa.

20 En una realización adicional, el procedimiento de fraccionamiento de la invención comprende el enriquecimiento de dicha Mezcla A, para dar variadas mezclas nuevas, del modo siguiente:

- (i) una pasta que comprende aproximadamente 3 - 50 % en peso de diglicéridos y aproximadamente 7 - 48 % en peso de ésteres de fitosterol y/o fitostanol que consisten principalmente en ésteres de ácidos grasos saturados, preferentemente ésteres de ácidos grasos C₁₄-C₂₂, saturados y, en particular, de ácidos grasos C₁₆-C₁₈ saturados (en el presente documento denominado Mezcla B);
- 25 (ii) un aceite que comprende aproximadamente 3 - 50 % en peso de diglicéridos y aproximadamente 7 - 48 % en peso de ésteres de fitosterol y/o fitostanol que consisten principalmente en ésteres de ácidos grasos insaturados, preferentemente ésteres de ácidos grasos C₁₄-C₂₂, insaturados y, en particular, de ácidos grasos C₁₆-C₁₈ insaturados (en el presente documento denominado Mezcla C);
- (iii) un sólido que comprende aproximadamente 60 % en peso de ésteres de fitosterol que consiste principalmente en ésteres de ácidos grasos saturados, preferentemente ésteres de ácidos grasos C₁₄-C₂₂, saturados, y, en particular, de ácidos grasos C₁₆-C₁₈ saturados (en el presente documento denominado Mezcla B1);
- 30 (iv) una pasta que comprende aproximadamente 30-35 % en peso de ésteres de fitosterol que consiste principalmente en ésteres de ácidos grasos insaturados, preferentemente ácidos grasos C₁₄-C₂₂, saturados, y, en particular, de ácidos grasos C₁₆-C₁₈ saturados (en el presente documento denominado Mezcla C1);
- 35 (v) ésteres de fitosterol altamente purificados que consisten principalmente en ésteres de ácidos grasos saturados, preferentemente ésteres de ácidos grasos C₁₄-C₂₂, saturados, y, en particular, de ácidos grasos C₁₆-C₁₈ saturados (en el presente documento denominado Mezcla B2); y
- 40 (vi) ésteres de fitosterol altamente purificados que consisten principalmente en ésteres de ácidos grasos insaturados, preferentemente ésteres de ácidos grasos C₁₄-C₂₂, saturados, y, en particular, de ácidos grasos C₁₆-C₁₈ saturados (en el presente documento denominado Mezcla C2).

Estas variadas mezclas de ésteres de fitosterol pueden ser útiles en un amplio campo de aplicaciones tales como, por ejemplo, En la industria alimentaria, tanto como un producto final tal como un nutriente dietético, y como un ingrediente funcional en los productos alimenticios y como suplemento alimenticio.

45 Como se ha mencionado, las mezclas de la invención pueden prepararse también por simple mezcla de diglicéridos y éster(es) de fitosterol o fitostanol en aceite de pescado comestible. Por tanto, la invención proporciona además varias mezclas de diglicérido(s) y éster(es) de fitosterol o fitostanol en aceite de pescado comestible. De acuerdo con la invención, estas mezclas pueden contener 1-99 % en peso de éster(es) de fitosterol o fitostanol, 1-99 % en peso de diglicéridos y nada o hasta 50 % en peso de monoglicéridos, preferiblemente de 3 a 50 % en peso de diglicéridos y de 7 a 48 % en peso de ésteres de fitosterol o de fitostanol.

50 La capacidad para preparar una composición en la que el tipo de éster (es) de fitosterol y / o fitostanol que está predeterminado es de gran importancia. Más específicamente, de acuerdo con la presente invención, es posible preparar una composición en la que el(los) éster(es) de fitosterol y / o fitostanol en la composición se determinan previamente mediante la adición de los fitosterol(es) y / o fitostanol(es) deseados a un aceite de pescado particular durante el procedimiento de esterificación. La separación, después del procedimiento de esterificación de las fracciones de aceite y de tipo pasta, proporciona una composición que consiste principalmente en el éster(es) de fitosterol y / o de fitostanol deseado, que contienen residuos de ácidos grasos insaturados y / o una composición que consiste principalmente en el(los) éster(es) de fitosterol y / o fitostanol deseados que contienen residuos de ácidos grasos saturados. Los triglicéridos en el aceite y / o la grasa pueden servir como fuente interna para el (los) grupo(s) de acilo graso en el procedimiento de esterificación de fitosterol y / o fitostanol. Como alternativa, o adicionalmente, el

(los) ácido (s) graso (s) libre (s) y / o sus derivados pueden servir como fuente externa para grupos acilo.

Los procedimientos de purificación y enriquecimiento de la invención también pueden proporcionar ésteres de fitosterol y / o fitostanol altamente purificados.

5 La composición y los nutrientes de la invención pueden formularse en formas de unidad de dosificación. Por ejemplo, las formas farmacéuticas que se pueden administrar por vía oral pueden ser un comprimido o cápsula. Cada unidad de dosificación para administración oral puede contener la cantidad diaria recomendada de una mezcla de la invención, o partes o multiplicaciones de la misma. La dosis recomendada es generalmente determinada por el médico o dietista que lo atiende, y dependerá de la edad, el sexo, el peso y el estado general del consumidor potencial.

10 Para la preparación de comprimidos, se puede usar cualquier vehículo farmacéutico usado rutinariamente para preparar formulaciones sólidas, por ejemplo, estearato de magnesio, almidón, terra alba, talco, gelatina, goma arábiga, ácido esteárico, lactosa y sacarosa. Para la preparación de cápsulas, cualquier encapsulación de rutina es adecuada, por ejemplo usando los citados vehículos en una envoltura de cápsula de gelatina dura. Las cápsulas de envoltura de gelatina blanda pueden prepararse también utilizando cualquier vehículo farmacéutico usado rutinariamente para preparar dispersiones o suspensiones, tales como gomas acuosas, celulosas, silicatos o aceites, que se pueden incorporar en una envoltura de cápsula de gelatina blanda.

15 Debe observarse que en la presente descripción los términos diglicéridos y diacilgliceroles se utilizan de manera intercambiable, y también lo son los términos fase y fracción, y pasta, de tipo pasta y extensión.

20 Divulgado y descrito, debe entenderse que la presente invención o ha de limitarse a los ejemplos concretos, etapas del procedimiento, y los materiales divulgados en el presente documento, ya que tales etapas y materiales del procedimiento pueden variar algo. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento se usa con el fin de describir únicamente formas de realización concretas y no se pretende que sean limitantes, ya que el ámbito de la presente invención solo estará limitado por las reivindicaciones adjuntas y equivalentes de las mismas.

Debe destacarse que, como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" o "la" incluyen referencia en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

25 A lo largo de esta memoria descriptiva y de las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto indique lo contrario, el término "comprende", y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", se entenderá que implican la inclusión de un número entero o etapa o grupo de números enteros indicados o etapas, pero no la exclusión de ningún otro número entero o etapa o grupo de números enteros .

30 Los siguientes ejemplos son representativos de las técnicas empleadas por los inventores en la realización de aspectos de la presente invención. Debe apreciarse que aunque estas técnicas son ejemplos de realizaciones preferidas para la práctica de la invención, los expertos en la materia, a la vista de la presente divulgación, reconocerán que pueden hacerse diversas modificaciones sin alejarse del alcance previsto de la invención.

Ejemplos

Procedimiento

35 (1) Preparación de productos: Mezcla A y fracciones B y C

La mezcla A se define como la mezcla obtenida después de la esterificación directa y / o alcoholisis + interesterificación de fitosteroles y / o fitostanoles en aceite en presencia de ácidos grasos libres y / o los correspondientes monoglicéridos, diglicéridos o triglicéridos. Por ejemplo:

40 La reacción se lleva a cabo por lotes. Al aceite o grasa se añaden lipasa inmovilizada revestida con tensioactivo y fitosteroles o estanoles vegetales. La mezcla típica contiene: 1-10 partes de aceite por 1 parte de catalizador y 1-10 partes de aceite por 1 parte de fitosterol (o estanol vegetal). La mezcla de reacción se mezcla luego y se calienta a 35-70 °C, preferiblemente a 50-60 °C durante 5-96 horas, preferentemente 10-48 horas. La conversión de fitosteroles o fitostanoles en ésteres de fitosterol o en ésteres de fitostanol se determina mediante cromatografía de gases. Las muestras pesadas de la mezcla de reacción (sin catalizador) se toman del lote y se diluyen en n-hexano o tolueno hasta concentraciones de 20-60 mg / ml y se inyectan directamente en la CG de acuerdo con el procedimiento descrito a continuación. La concentración de fitosteroles o fitostanoles libres se determina cuantitativamente (de acuerdo con las curvas de calibración) y la conversión se calcula en relación con las concentraciones iniciales de fitosteroles. La reacción se detiene usualmente en la conversión de 70-100 %, típicamente del 85-95 %.

50 La mezcla A, por tanto, contiene ésteres de fitosterol y el residuo de fitosteroles libres que no sufrieron esterificación.

Además, la mezcla A resultante de la reacción entre fitosteroles y grasa o aceite natural contendrá diglicéridos, monoglicéridos y alguna concentración de ácidos grasos libres. El enriquecimiento en diglicéridos y monoglicéridos se logra mediante la "donación" de ácidos grasos de triglicéridos a la formación de ésteres de fitosterol.

Al final de la reacción, el catalizador se separa del aceite mediante filtración en caliente a la temperatura de reacción. Después de enfriar a temperatura ambiente o menor, la Mezcla A obtenida forma una suspensión líquida sólida con dos fases visiblemente distintas y separadas (también denominadas fracciones):

- 5 Mezcla B: fase en forma de pasta; y
Mezcla C: una fase oleosa.

Las dos fases son distintas por el tipo de ésteres de fitosterol que contienen. La fase oleosa (fracción C) se enriquece con ésteres de ácidos grasos insaturados, tales como, por ejemplo, ácidos oleico, linoleico y linolénico, mientras que la fase de extensión (fracción B) se enriquece con ésteres de ácidos grasos saturados, tales como, por ejemplo, ácidos palmítico y esteárico.

- 10 La separación de la mezcla A con respecto a la fracción B y la fracción C puede obtenerse por centrifugación de la mezcla A durante 5-60 minutos, preferiblemente 10-30 minutos a 3.000-14.000 y 10-25 °C.

La fracción B se obtiene en su forma de tipo pasta como la fase inferior y la fracción C se obtiene como aceite transparente como la fase superior.

- 15 Dejar la fracción C a temperatura ambiente durante 1-10 días puede resultar en una mayor precipitación residual de la pasta y pérdida de claridad del aceite. La forma clara se obtendrá mediante una segunda centrifugación o mediante filtración.

- 20 La figura 3 representa el cromatograma de gases de la Mezcla A, forman la reacción entre los fitosteroles de madera y el aceite de girasol tomado a 60 °C. La mezcla comprende ésteres de fitosterol (16 % en peso) derivados de aceite de girasol (6 picos principales que van desde 16,136-15,413 minutos), triglicéridos del aceite (17,083 y 16,707), diglicéridos (12,642), fitosteroles (3 picos principales, que varían de 11,663-11,182) y ácidos grasos libres (9,586, 8,686, 6,69).

- 25 La figura 4 representa un cromatograma de gases de la Mezcla B. La mezcla comprende ésteres de fitosterol de ácidos grasos saturados (15,966, 15,751, 15,361) con una parte menor de ésteres de fitosterol de ácidos grasos insaturados (16,335, 16,159, 16,044), triglicéridos del aceite (16,904, 17,26), diglicéridos (12,348), fitosteroles (11,861, 11,580, 11,125) y una cantidad minoritaria de ácidos grasos libres. La cantidad total de ésteres de esterol en esta mezcla es 31 % (p / p).

- 30 La figura 5 representa un cromatograma de gases de la Mezcla B. La mezcla comprende ésteres de fitosterol de ácidos grasos saturados (16,009, 15,825, 15,686), triglicéridos derivados del aceite (16,981,16,597), diglicéridos (12,506), fitosteroles (11,526,11,242, 11,043) y cantidades minoritarias de ácidos grasos libres. La cantidad total de ésteres de esterol en esta mezcla es 15 % (p / p).

Ejemplos de aceites y grasas naturales son aceites de plantas y vegetales (aceite de linaza, aceite de colza, aceite de maíz, aceite de oliva, manteca de cacao, aceite de salvado de arroz, aceite de soja, aceite de palma, aceite de almendra, aceite de ricino, aceite de semilla de algodón, aceite de coco, aceite de cacahuete, aceite de girasol, y similares), aceites animales (grasa de la leche, aceite de pescado y similares).

- 35 Ejemplos de fitosteroles y fitostanoles son beta-sitosterol, campesterol, estigmasterol y brassicasterol, y estigmasterol, campestanol y sitostanol.

(2) Cromatografía de gases

- 40 Las concentraciones de fitosteroles, fitostanoles, ésteres de fitosterol, ésteres de fitostanol, ácidos grasos y triglicéridos se determinaron por cromatografía de gases, HP-5890, equipado con un detector de ionización de llama. Una columna capilar, Quardex 400-1HT se usó bajo las siguientes condiciones de separación: se mantuvieron las temperaturas del inyector y del detector a 350 °C, temperatura de la columna inicial de 160 °C, seguido de una isoterma de 2 minutos; a continuación, la temperatura del horno se elevó a una velocidad de 5 °C / min a 180 °C; a continuación, la temperatura del horno se elevó a una velocidad de 20 °C / min a 400 °C, seguido de una isoterma de 10 minutos.

- 45 **(3) Mayor comprensión del fraccionamiento entre las mezclas B y C**

Con el fin de seguir aprendiendo el fraccionamiento a las mezclas B y C, se llevó a cabo la reacción con diversos tipos de aceites que variaban por las composiciones de ácidos grasos. Para cada fuente de aceite, la reacción como se ha descrito anteriormente y las fracciones B, C se separan y se pesan.

- 50 La Tabla 1 presenta los porcentajes en peso de la fracción oleosa (B) y la fracción extendida (C) obtenidas de la reacción de esterificación de fitosteroles con la fuente de soja en diferentes aceites. La reacción se llevó a cabo en una incubadora agitadora a 50 °C durante 24 horas, con una relación en peso de fitosteroles: aceite de 1: 9 y relación catalizador:aceite de 1:5.

Tabla 1

Fracción en masa de las fracciones B (extensión) y C (aceite) obtenidas de la esterificación de los fitosteroles de soja en diferentes aceites vegetales			
Tipo de aceite utilizado en la reacción	Ácidos grasos saturados en aceite comestible (% p / p)	Fracción en masa de la fase oleosa (mezcla C) (% p / p)	Fracción en masa de la fase extendida de I (mezcla B) (% p / p)
Trioleína pura*	0	100	0
Aceite de pescado**	1	100	0
Canola***	9,2	93	7
Girasol***	11,0	91,5	8,5
Soja***	15,8	80	20
Oliva****	19,8	76	24

*Pureza estándar de trioleína > 99% -Sigma ** Epax 2050- "Pronova" *** Fuentes comerciales refinadas **** Aceite de oliva virgen extra

A partir de la Tabla 1 se muestra claramente que la fracción en masa de la fase extendida (mezcla B) aumenta con el aumento de la proporción de ácidos grasos saturados en la fuente de ácidos grasos: el aceite en este caso.

- 5 Además, la mezcla A y las fracciones B y C se analizan adicionalmente para evaluar las diferencias en la composición de ácidos grasos en las moléculas de ésteres de fitosterol.

10 La purificación de ésteres de fitosterol de la mezcla se consigue por cromatografía en columna de vidrio usando gel de sílice 60 de Merck (0,04-0,063µm) y mezcla de éter de petróleo: éter (2-10 % de éter) como disolvente. En este sistema de separación, los ésteres de fitosterol se eluyen primero y son fáciles de purificar. Las fracciones que contenían ésteres de fitosterol se combinaron y los ácidos grasos en la fracción de ésteres de fitosterol pura, se transfirieron a ésteres metílicos aplicando el procedimiento de AOC Ce-2-66. La separación y cuantificación de ésteres metílicos se realizó en cromatografía de gases capilar usando un patrón interno.

La Tabla 2 presenta la composición de ácidos grasos de aceites vegetales seleccionados como referencia a los resultados de la fracción.

- 15 Las Tablas 3-5 presentan la composición de ácidos grasos de las mezclas A, B, y C resultantes de reacciones con diferentes tipos de aceites.

SFA designa ácidos grasos saturados, MUFA designa ácidos grasos monoinsaturados y PUFA designa ácidos grasos poliinsaturados. Las condiciones de reacción son similares a las descritas para la Tabla 1.

Tabla 2

Contenido en ácidos grasos de los aceites vegetales			
Tipo de aceite	Composición de ácidos grasos en aceite		
	SFA % en peso	MUFA % en peso	PUFA % en peso
Oliva	20	69,5	10,5
Canola	9	55	36
Soja	16	23,5	60,5
Girasol	11	27,5	61,5

Tabla 3

Contenido de ácidos grasos de los ésteres de fitosterol obtenidos en la mezcla A			
Tipo de aceite	Composición en ácidos grasos de los ésteres de fitosterol		
	SFA % en peso	MUFA % en peso	PUFA % en peso
Oliva	17	64	19
Soja	11	25	64

Tabla 4

Contenido de ácidos grasos de los ésteres de fitosterol obtenidos en la mezcla B (fase de extensión)			
Tipo de aceite	Composición en ácidos grasos de los ésteres de fitosterol		
	SFA % en peso	MUFA % en peso	PUFA % en peso
Oliva	32	53	15
Canola	30	45	26
Soja	41	17	42
Girasol	43	17	40

5

Tabla 5

Contenido de ácidos grasos de los ésteres de fitosterol obtenidos en la mezcla C (fase de aceite-líquido)			
Tipo de aceite	Composición en ácidos grasos de los ésteres de fitosterol		
	SFA % en peso	MUFA % en peso	PUFA % en peso
Oliva	6	73	21
Canola	4	59	37
Soja	5	26	69
Girasol	4	25	67

Los datos presentados en las Tablas 2-5 indican lo siguiente:

1. Al comparar las tablas 2 y 3, se puede ver que la relación entre ácidos grasos saturados a insaturados en los ésteres de fitosteroles depende de la composición de ácidos grasos del aceite usado en la reacción. En otras palabras, se puede decir que $(MUFA + PUFA) / SFA$ en las mezclas A (Tabla 3) se asemeja mucho a la misma proporción en los aceites naturales (Tabla 2).
2. La comparación de las Tablas 4 a 5 conduce a la conclusión de que la característica principal que diferencia los ésteres de fitosterol contenidos en las mezclas B (extensión) y C (aceite) es la composición de ácidos grasos. Más específicamente, la reacción de esterificación da lugar a enriquecimiento de ésteres de fitosterol de ácidos grasos saturados en la fracción B y ésteres de fitosteroles de ácidos grasos insaturados en la fracción C. Este fraccionamiento de los ésteres de esteroides permite la formación de dos fases distintas.
3. A partir de la Tabla 5 se puede observar que la fase oleosa (fracción C) contiene por encima del 94 % de ésteres de fitosterol de ácidos grasos insaturados, Independientemente de la composición de ácidos grasos insaturados del aceite de origen.

4. La diferencia en la forma física de la fracción B (extensión) y la fracción C (líquido) se explica a través de la concentración relativamente alta de ésteres de fitosteroles de ácidos grasos saturados en la fase de extensión que son responsables del punto de fusión más alto de la extensión.

(4) Enriquecimiento adicional de las mezclas A, B y C

5 4.1. Enriquecimiento de la fracción A con ésteres de fitosteroles y diglicéridos por destilación molecular

Se puede obtener un enriquecimiento adicional del producto de reacción con diglicéridos y ésteres de fitosterol introduciendo destilación molecular. Los tres componentes principales se destilan en un orden según su peso molecular: primero los diglicéridos, después, los ésteres de fitosterol y después los triglicéridos. Por lo tanto, la modificación la composición de la corriente de alimentación y las condiciones de destilación puede conducir a un destilado enriquecido en diglicéridos y fitosterol y residuo enriquecido en triglicéridos. Las condiciones de destilación de 0,001-0,01 mbares, preferiblemente 0,001 - 0,005 mbares y 200 - 300 °C, preferentemente de 220-280 °C, permiten una destilación de los 2 componentes más ligeros: diglicéridos y ésteres de fitosterol.

4.2 Enriquecimiento de las fracciones B y C con ésteres de fitosterol por cristalización

Debido a la solubilidad relativamente baja y al alto punto de fusión de los ésteres de fitosterol en comparación con otros componentes del producto, la disolución de las fracciones en diversos disolventes orgánicos seguida de una etapa de enfriamiento conduce a una cristalización selectiva de ésteres de fitosterol. Este procedimiento permite un aumento en la concentración de ésteres de fitosterol.

Los disolventes orgánicos que se pueden usar son hexano, tolueno, acetona, etanol, metanol y otros.

Ejemplo 1: Alcoholisis catalizada por lipasa de estigmasterol en aceite de canola

20 1.1 Reacción enzimática

La conversión catalizada por lipasa de estigmasterol en éster de estigmasterol de en aceite de canola se realizó usando las siguientes condiciones de reacción: Se añadieron 9 g de una preparación de lipasa obtenida de acuerdo con el documento WO 01/75083 a 50 ml de aceite de canola enriquecido con 4 g de estigmasterol. Después, la reacción se calentó hasta 60 °C durante 14 horas. Después de este período, se tomaron muestras, se diluyeron con n-hexano (30µl de mezcla de reacción/600µl de n-hexano) y se inyectaron en un sistema de cromatografía de gases, como se ha descrito anteriormente. La concentración de estigmasterol sin reaccionar se determinó de acuerdo con CG y la conversión se calculó como 94 %.

1.2 Separación de los productos e reacción

Al final de la reacción, la enzima se filtró y la mezcla se enfrió a 25 °C y se dejó durante 12 horas.

30 La mezcla obtenida (en lo sucesivo denominada Mezcla A) tiene dos fases / fracciones separadas distintas: una fase / fracción de aceite y una fase / fracción de extensión (de tipo pasta).

Las mezclas A y C se obtienen mediante centrifugación de la mezcla A durante 5 minutos, a 8.000 x rpm a aproximadamente 15 °C.

Las figuras 1 y 2 demuestran el análisis del cromatograma de gases de ambas fracciones individuales.

35 La figura 1 representa el cromatograma de gas de la Mezcla B obtenido por alcoholisis de estigmasterol en aceite de canola. La mezcla comprende palmitato de estigmasterol (como se confirma por medio de un análogo químicamente sintetizado) (16,5 minutos), triglicéridos derivados del aceite de canola (19,35-18,12-minutos), diglicéridos (14,37 minutos), estigmasterol (10,73 minutos) monoglicéridos (11,42 minutos) y ácidos grasos libres (8,72 - 6,54 minutos).

40 La figura 2 representa el cromatograma de gas de la Mezcla C obtenido por alcoholisis de estigmasterol en aceite de canola. La mezcla comprende oleato de estigmasterol (confirmado por un patrón análogo químicamente sintetizado) (15,96 minutos), palmitato de estigmasterol palmitato (16,56 minutos) triglicéridos del aceite (19,42-18,17), diglicéridos (14,38), estigmasterol (10,76 minutos), monoglicéridos (11,45 minutos) y ácidos grasos libres (8,75 - 6,57 minutos).

Ejemplo 2: Alcoholisis catalizada por lipasa de fitosteroles de la fuente de soja en aceite de oliva

2.1 La reacción enzimática

45 100 g de una preparación de lipasa obtenida de acuerdo con el documento WO 01/75083 y 120 g de fitosteroles de la fuente de soja (que contiene 0,3-4 % de brassicasterol, 20-30 % de campesterol; 11-20 % de estigmasterol; >40% de beta sitosterol) se añadieron a 450 g de aceite de oliva virgen extra en un reactor de vidrio de 1 litro agitado. La mezcla de reacción se calentó después hasta 50 °C y se agitó durante 24 horas. La conversión de la reacción fue del 93 %. El catalizador se separa por filtración a 50 °C. El catalizador filtrado se añade a una mezcla fresca de 450 g de aceite de
50 oliva virgen extra con 120 g de fitosteroles sin reaccionar. El 2º lote alcanza una conversión del 93 % después de 24

horas también. La filtración del catalizador se repite y se dejan a 566 g del producto (mezcla A) a temperatura ambiente durante 20 horas.

Las mezclas A y C se obtienen mediante centrifugación de la mezcla A durante 15 minutos, a 7,500 x g y 25 °C.

La mezcla B, la fracción extendida, tenía 164 g de peso, mientras que la mezcla C, la fracción oleosa, pesaba 402 g.

- 5 La composición de la mezcla A fue: 16,3 % de diglicéridos, 6,18 % de monoglicéridos, 30,5 % de ésteres de fitosterol y 5 % de ácidos grasos libres y equilibrio de triglicéridos.

Las composiciones de ácidos grasos de ésteres de fitosterol de las fracciones B y C se determinaron como se ha descrito anteriormente. Los resultados se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6

Composición en ácidos grasos de los ésteres de fitosterol		
Ácido graso	% en aceite (fracción C)	% en extensión (fracción B)
C16	3,0	29,9
C16:1	1,8	1,2
C18	1,2	2,0
(C18:1)	71,5	51,7
(C18:2)	20,9	14,1
C18:3	1,4	0,9
C20	0,2	0,1

10

Ejemplo 3: Enriquecimiento adicional de éster de fitosterol y diglicéridos por destilación molecular:

Una mezcla de reacción obtenida a partir de una fuente de aceite de canola que contiene: 13 % en peso de ésteres de fitosterol, 20 % en peso de diglicéridos, 0,1-1 % en peso de fitosteroles libres y 5 % en peso de ácidos grasos libres se alimentó a un alambique molecular (fabricado con vidrio, de 2 pulgadas de diámetro, unidad de lab). El primer pase se llevó a cabo en condiciones que permitieron la eliminación de fitosterol libre y ácidos grasos libres: 180-200 °C y 0,01-0,001 mbares. El residuo del primer pase se alimentó de nuevo en diferentes condiciones que permiten diversas composiciones destiladas, tal como se muestra en las Tablas 7 y 8. PSE designa ésteres de fitosterol.

15

Tabla 7

Rendimiento de masa destilada y de ésteres de fitosterol en la fracción de destilado (0,001-0,005 mbares a diferentes temperaturas)		
Temp, (°C)	Masa destilada/masa de alimentación	Masa de PSE en masa destilada/de PSE en la alimentación
235	0,17	0,40
240	0,23	0,58
250	0,28	0,62
265	0,53	0,95

20

Con el fin de obtener más del 90 % de ésteres de fitosterol en la fase destilada se encontró que las condiciones necesarias eran: 260-265 °C y 0,001-0,005 mbares.

Tabla 8

Composición del destilado obtenido en la destilación (0,001 - 0,005 mbares a diferentes temperaturas)			
Temp, (°C)	Composición del destilado		
	Ésteres de fitosterol % en peso	Triglicéridos % en peso	Diglicéridos % en peso
235	27	22	51
240	32	28	40
250	32	25	43
265	27	52	21

Los cálculos se realizaron basándose en el equilibrio de la masa de alimentación y en el área integrada relativa obtenida a partir de la CG.

5 **Ejemplo 4: Enriquecimiento adicional de ésteres de fitosterol en la fracción B y C mediante cristalización con disolvente**

(i) Para concentrar el contenido de éster de fitosterol en la Mezcla C, Se añadieron 100 ml de acetona a 100 ml de la Mezcla C obtenida como se describe en el Ejemplo 2 anterior. La mezcla se enfrió -20 °C durante 12 horas. Durante este periodo se depositó una precipitación sólida blanca (Mezcla C1) a partir de la mezcla oleosa. La precipitación de sólidos (25 g) se filtró en un procedimiento de filtración en frío y se lavó varias veces con acetona fría.

La figura 6 representa el cromatograma de gases de la Mezcla C1. La mezcla comprende ésteres de fitosterol de ácidos grasos insaturados (16,247, 16,067, 15,934), triglicéridos derivados del aceite (17,119, 16,814), diglicéridos, fitosteroles (11,764, 11,486, 11,291) y cantidades minoritarias de ácidos grasos libres. La cantidad total de ésteres de esterol en esta mezcla es 30 % (p / p).

(ii) Para concentrar adicionalmente el contenido de éster de fitosterol en la Mezcla C, Se añadieron 50 ml de tolueno a 20 g de la mezcla C sólida, obtenida como se ha descrito anteriormente, con calentamiento suave. La mezcla se enfrió -20 °C durante 12 horas. Durante este periodo se depositó una precipitación sólida blanca (Mezcla C2) a partir de la solución. La precipitación de sólidos (4 g) se filtró en un procedimiento de filtración en frío y se lavó varias veces con tolueno frío.

La figura 7 representa el cromatograma de gases de la Mezcla C2. La mezcla comprende ésteres de fitosterol de ácidos grasos insaturados (16,319, 16,125, 15,981), fitosteroles (11,151, 10,850, 10,640) y diglicéridos (13,24, 13,01). La cantidad total de ésteres de esterol en esta mezcla es > 90 % (p / p).

(i) Para concentrar el contenido de éster de fitosterol en la Mezcla B, Se añadieron 100 ml de hexano a 90 g de la Mezcla B obtenida como se describe en el Ejemplo 2. La mezcla se enfrió -20 °C durante 12 horas. Durante este periodo se depositó una precipitación sólida blanca (Mezcla B1) a partir de la solución. El precipitado sólido (35 g) se filtró en un procedimiento de filtración en frío y se lavó varias veces con hexano frío.

La figura 8 representa el cromatograma de gases de la Mezcla B1. La mezcla comprende principalmente ésteres de fitosterol de ácidos grasos insaturados (15,941, 15,752, 15,612), cantidad pequeña de ésteres de fitosterol de ácidos grasos insaturados (16,335, 16,159, 16,031), triglicéridos derivados del aceite (17,196, 16,870), diglicéridos, fitosteroles (11,830, 11,553, 11,190), diglicéridos (14,39), 13,97) y cantidades minoritarias de ácidos grasos libres. La cantidad total de ésteres de esterol en esta mezcla es 50 % (p / p).

(ii) Para concentrar adicionalmente el contenido de éster de fitosterol en la Mezcla B, Se añadieron 50 ml de tolueno a 20 g de la mezcla B sólida, obtenida como se describe en el Ejemplo 2, con calentamiento suave. La mezcla se enfrió -20 °C durante 12 horas. Durante este periodo se depositó una precipitación sólida blanca (Mezcla B2) a partir de la solución. El precipitado sólido (5 g) se filtró en un procedimiento de filtración en frío y se lavó varias veces con tolueno frío.

La figura 9 representa el cromatograma de gases de la Mezcla B2. La mezcla comprende principalmente ésteres de fitosterol de ácidos grasos insaturados (15,371, 15,184, 15,047), cantidad pequeña de ésteres de fitosterol de ácidos grasos insaturados (15,761, 15,588, 15,461) y fitosteroles (10,615, 10,310, 10,096). La cantidad total de ésteres de esterol en esta mezcla es > 95 % (p / p).

REIVINDICACIONES

1. Una composición de materia que comprende diacilglicerol(es) que son principalmente, 1,3-diacilglicerol(es) y al menos un éster de fitosterol y / o éster de fitostanol disueltos o dispersos en aceite de pescado.
- 5 2. Una composición de materia de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha composición se puede separar en dos fracciones visiblemente distintas que son una fracción oleosa que comprende diacilglicerol(es) que son, principalmente, 1,3-diacilglicerol(es), triacilglicerol(es) y ésteres de fitosterol y / o fitostanol de ácidos grasos principalmente insaturados y una fracción de tipo pasta que comprende diacilglicerol(es), que son, principalmente, 1,3-diacilglicerol(es), triacilglicerol(es) y ésteres de fitosterol y / o fitostanol de ácido(s) graso(s) principalmente saturados.
- 10 3. Una composición de materia de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha composición comprende dos fracciones que son una fracción oleosa que comprende diacilglicerol(es) que son, principalmente, 1,3-diacilglicerol(es), triacilglicerol(es) y ésteres de fitosterol y / o fitostanol de ácidos grasos principalmente insaturados y una fracción de tipo pasta que comprende diacilglicerol(es), que son, principalmente, 1,3-diacilglicerol(es), triacilglicerol(es) y éster(es) de fitosterol y / o fitostanol de ácido(s) graso(s) principalmente saturados.
- 15 4. Una composición de materia de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende de 1 a 99 % en peso de diacilglicerol(es) que son, principalmente, 1,3-diacilglicerol(es) y de 1 a 99 % de dichos éster(es) de fitosterol y / o éster(es) de fitostanol disueltos o dispersos en aceite de pescado.
5. Una composición de materia de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además monoglicéridos.
- 20 6. Una composición de materia de acuerdo con la reivindicación 4 o la reivindicación 5, que comprende de 1 a 99 % en peso de diacilglicerol(es) que son, principalmente, 1,3-diacilglicerol(es), de 1 a 99 % en peso de éster(es) de fitosterol y / o éster(es) de fitostanol y de 0 a 50 % en peso de monoglicéridos y de 1 a 99 % en peso de triacilglicerol(es), preferiblemente, dicha composición comprende de 3 a 50 % en peso de diacilglicerol(es) que son, principalmente, 1,3-diacilglicerol(es), de 7 a 48 % en peso de éster(es) de fitosterol y / o éster(es) de fitostanol y de 2 a 90 % en peso de triacilglicerol(es).
- 25 7. Una composición de materia de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que dicho fitosterol se selecciona del grupo que consiste en beta-sitosterol, campesterol, estigmasterol y brassicasterol, y en la que dicho fitostanol se selecciona del grupo que consiste en estigmastanol, campestanol y sitostanol.
- 30 8. Una composición de materia de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que dichos éster(es) de fitosterol y / o éster(es) de fitostanol son ésteres de ácidos grasos C_{14} - C_{22} , preferentemente C_{16} - C_{18} , saturados o insaturados, como, por ejemplo, ácidos oleico, linoleico, linolénico, palmítico y esteárico.
9. Una composición de materia de acuerdo con la reivindicación 8, en la que dichos éster(es) de fitosterol y / o éster(es) de fitostanol son ésteres de ácidos grasos C_{14} - C_{22} , preferentemente ésteres de ácidos grasos C_{16} - C_{18} , insaturados.
- 35 10. Una composición de materia de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende diacilglicerol(es) que son, principalmente, 1,3-diacilglicerol(es), triacilglicerol(es) y al menos un 25 % en peso de éster(es) de fitosterol y / o éster(es) de fitostanol de ácidos grasos principalmente insaturados.
11. Una composición de acuerdo con la reivindicación 10, que comprende al menos 95 % en peso de éster(es) de fitosterol y/o éster(es) de fitostanol de ácidos grasos principalmente insaturados.
- 40 12. Un suplemento alimentario dietético o producto alimenticio que comprende la composición de la materia de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
13. Un procedimiento de preparación de una composición de materia que comprende diacilglicerol(es) que son principalmente, 1,3-diacilglicerol(es) y al menos un éster de fitosterol y / o éster de fitostanol disueltos o dispersos en aceite de pescado comestible, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de esterificar los fitosterol(es) y / o fitostanol(es) en aceite de pescado para dar un producto (denominado Mezcla A) que consiste en al menos un éster de fitosterol y / o éster de fitostanol, y diacilglicerol(es) que son principalmente 1,3- di-acilglicerol(es) en aceite de pescado.
- 45 14. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dicho producto se puede separar en o comprende dos fracciones visiblemente distintas, siendo una fracción oleosa que comprende diacilglicerol(es) que son, principalmente, 1,3-diacilglicerol(es), triacilglicerol(es) y ésteres de fitosterol y / o fitostanol de ácidos grasos principalmente insaturados y una fracción de tipo pasta que comprende diacilglicerol(es), que son, principalmente, 1,3-diacilglicerol(es), triacilglicerol(es) y ésteres de fitosterol y / o fitostanol de ácido(s) graso(s) principalmente saturados.
- 50 15. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dicha fracción de aceite contiene aproximadamente 10-20 % en peso de éster(es) de fitosterol y / o fitostanol de ácido(s) graso(s) principalmente

insaturados y dicha fracción de tipo pasta de dicho producto contiene aproximadamente 30-35 % en peso de éster(es) de fitosterol y / o fitostanol de ácido(s) graso(s) principalmente saturados.

- 5 16. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 o 15, en el que dichos éster(es) de fitosterol y / o éster(es) de fitostanol son ésteres de ácidos grasos C_{14} - C_{22} , preferentemente C_{16} - C_{18} , saturados o insaturados, en el que dichos ácidos grasos se seleccionan del grupo que consiste en ácidos oléicos, linoleico, linolénico, palmítico y esteárico.
17. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en la que dicho fitosterol se selecciona del grupo que consiste en beta-sitosterol, campesterol, estigmasterol, brassicasterol, y dicho fitostanol se selecciona del grupo que consiste en campestanol y sitostanol.
- 10 18. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, que comprende además las etapas de separar las dos fracciones de dicha Mezcla A, para dar un primer producto (denominado Mezcla B) que comprende diacilglicerol(es), que son, principalmente 1,3-diacilglicerol(s), triacilglicerol(es) y éster(es) de fitosterol y / o éster(es) de fitostanol de ácidos grasos principalmente saturados y un segundo producto (denominado Mezcla C) que comprende diacilglicerol(es), que son, principalmente, 1,3-diacilgliceroles, triacilglicerol(es) y éster(es) de fitosterol y / o fitostanol de ácido(s) graso(s) principalmente saturados.
- 15 19. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 18, en el que la separación de las dos fracciones de la Mezcla A se puede llevar a cabo por centrifugación.
- 20 20. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 18, en el que el contenido de éster(es) de fitosterol y / o éster(es) de fitostanol en la Mezcla C se enriquece adicionalmente para formar un producto (denominado Mezcla C1) que comprende al menos 25 % en peso de ésteres de fitosterol y / o fitostanol de ácidos grasos principalmente insaturados.
21. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 20, en el que dicha Mezcla C se enriquece por tratamiento con acetona.
- 25 22. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 20, en el que dicha Mezcla C se enriquece por tratamiento con tolueno, para dar ésteres de fitosterol y / o fitostanol puros (al menos 95 % en peso) de ácidos grasos principalmente insaturados (denominados Mezcla C2).
23. Uso de una composición de materia que comprende una mezcla de diacilglicerol(es) que son, principalmente, 1,3-diacilglicerol(es) y con éster(es) de fitosterol y / o éster(es) de fitostanol de, principalmente, ácidos(s) graso(s) insaturados disueltos o dispersos en aceite de pescado, como un nutriente dietético o suplemento alimentario.
- 30 24. Un nutriente dietético o suplemento alimentario de acuerdo con la reivindicación 12, que comprende además monoacilglicerol(es).
25. Un nutriente dietético o suplemento alimentario de acuerdo con la reivindicación 12 o la reivindicación 24, en forma de unidad de dosificación, preferiblemente un comprimido o cápsula.
- 35 26. Un nutriente dietético de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12, 24 y 25, que es uno cualquiera de mantequilla baja en colesterol, manteca de cacao, grasa de leche anhidra, helado, blanqueador de café y crema, producto lácteo, particularmente queso y otros alimentos que contienen colesterol.

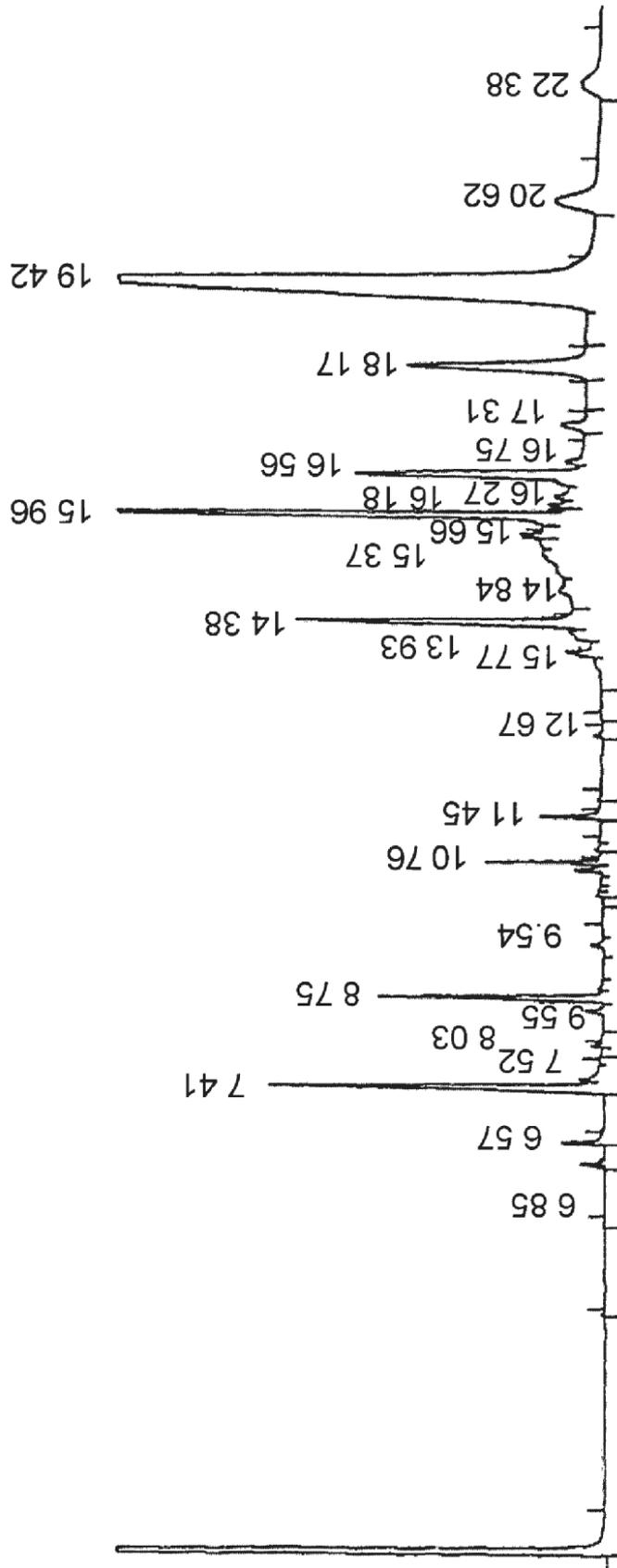


Fig. 2

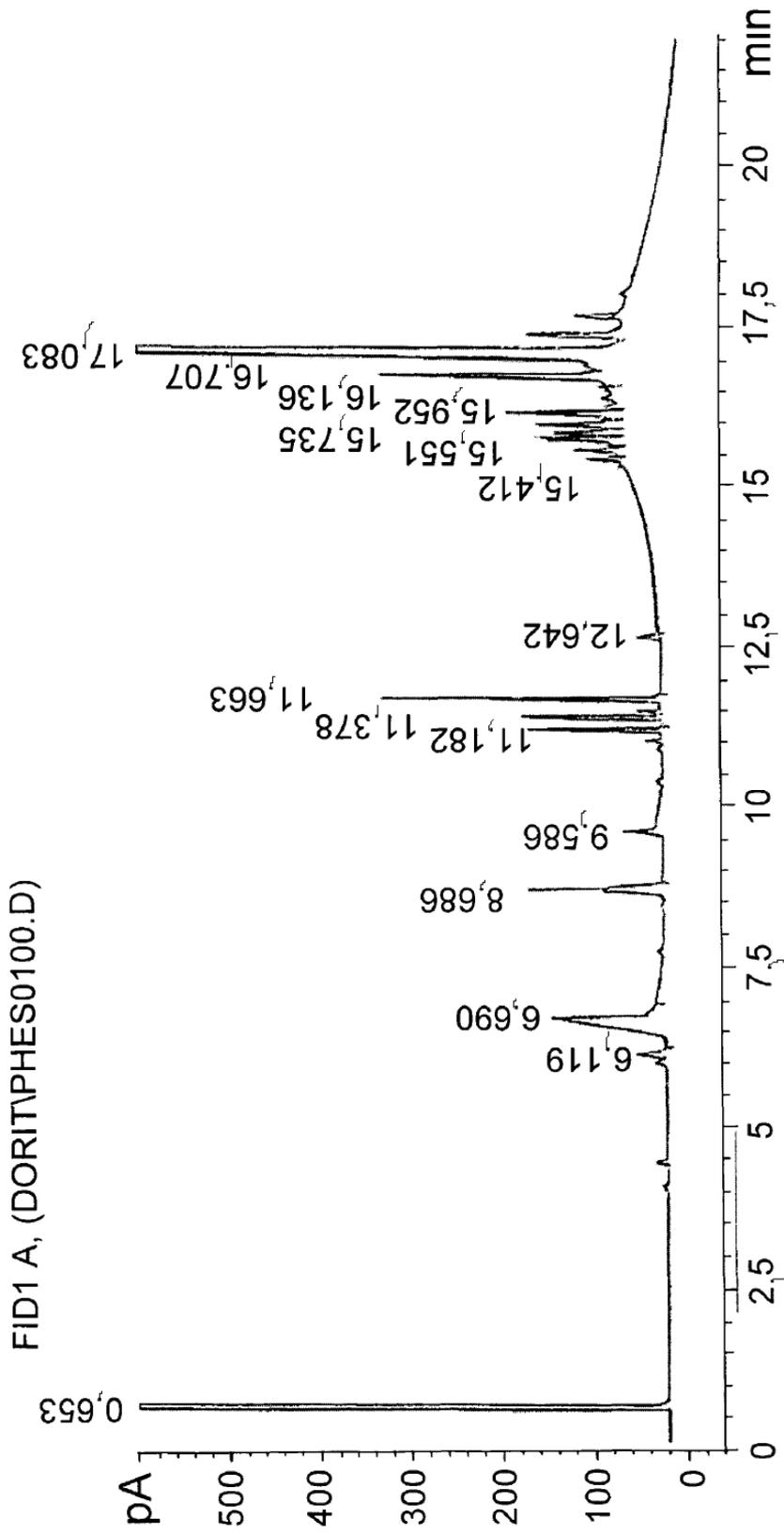


Fig. 3

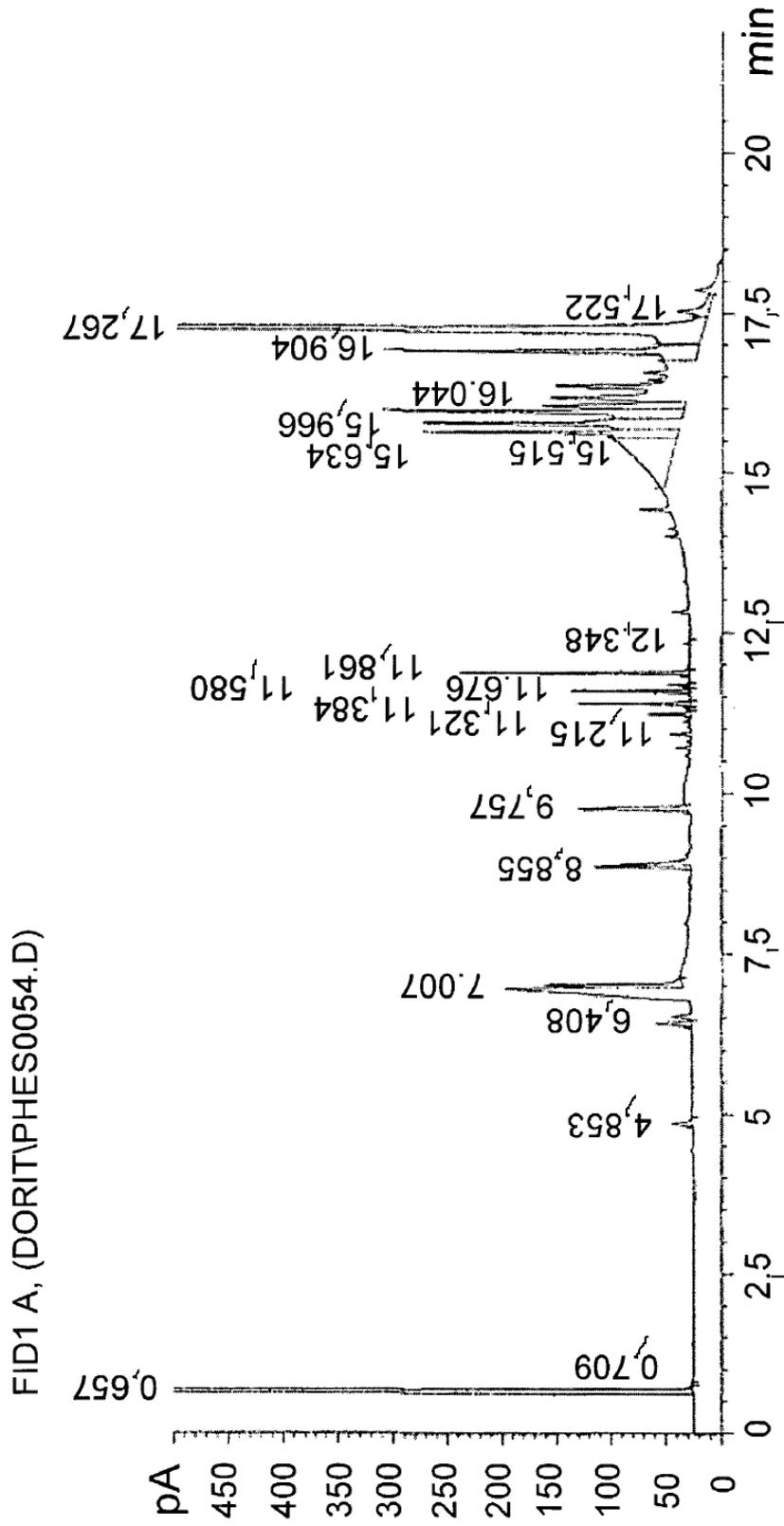


Fig. 4

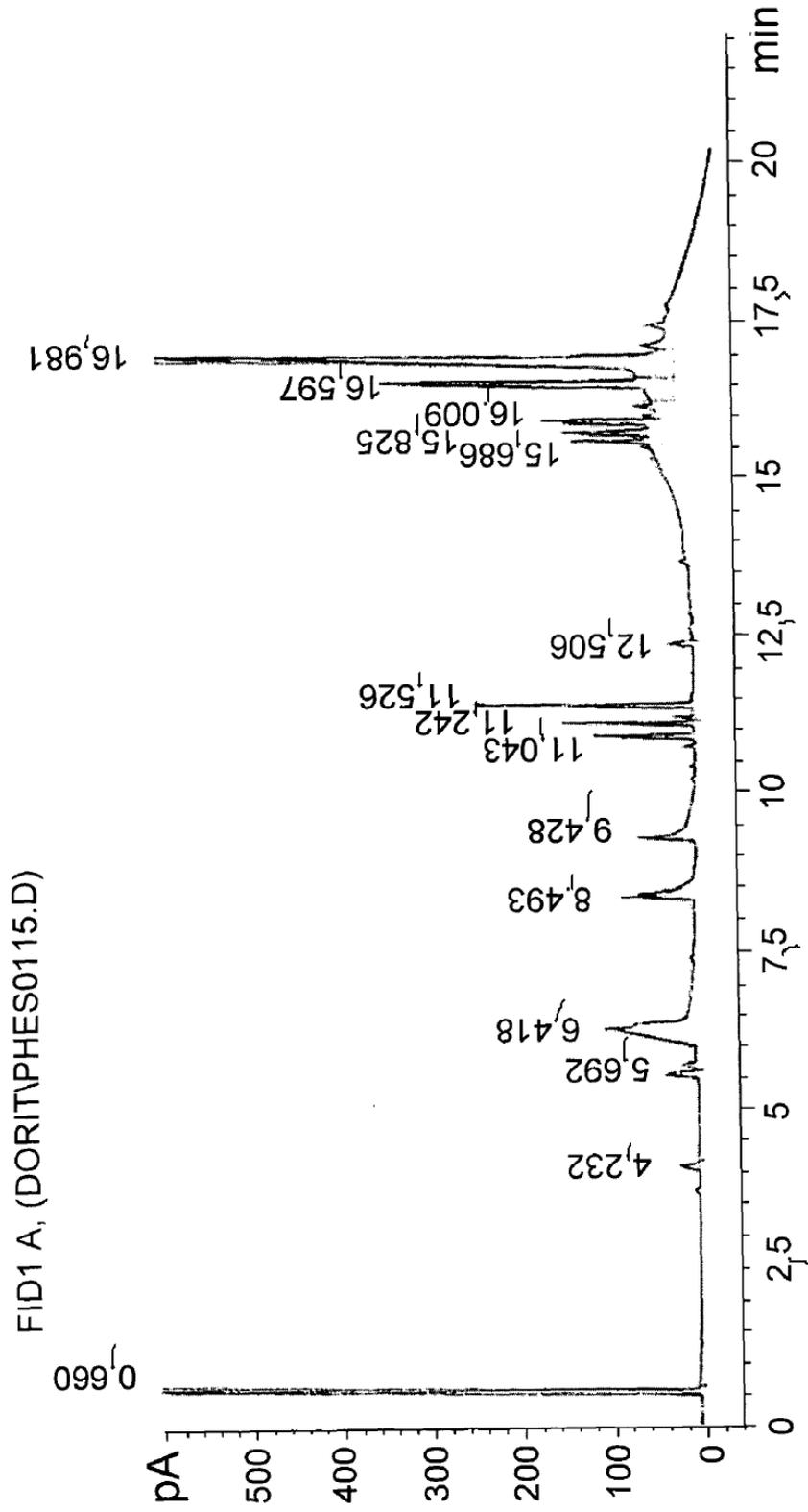


Fig. 5

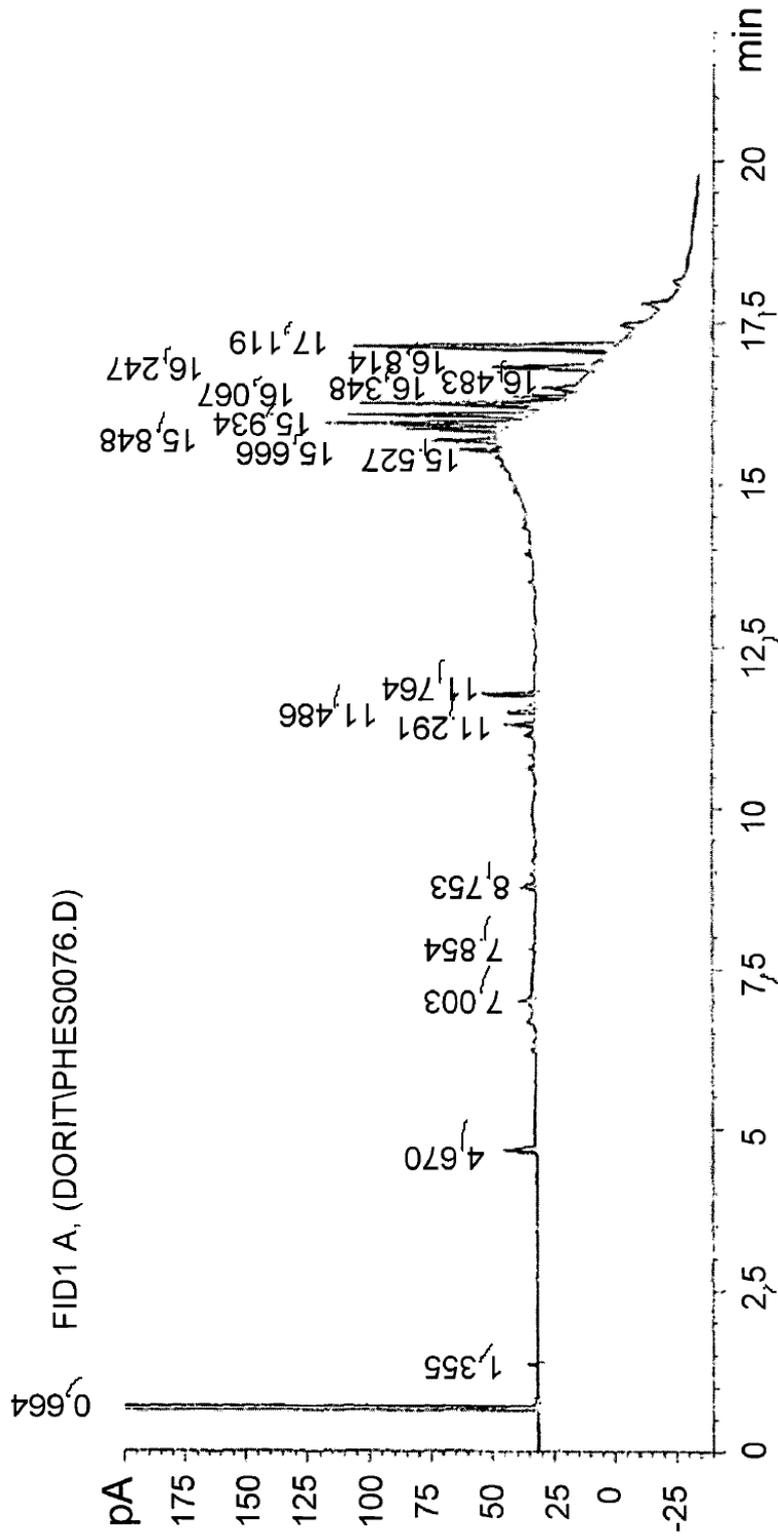


Fig. 6

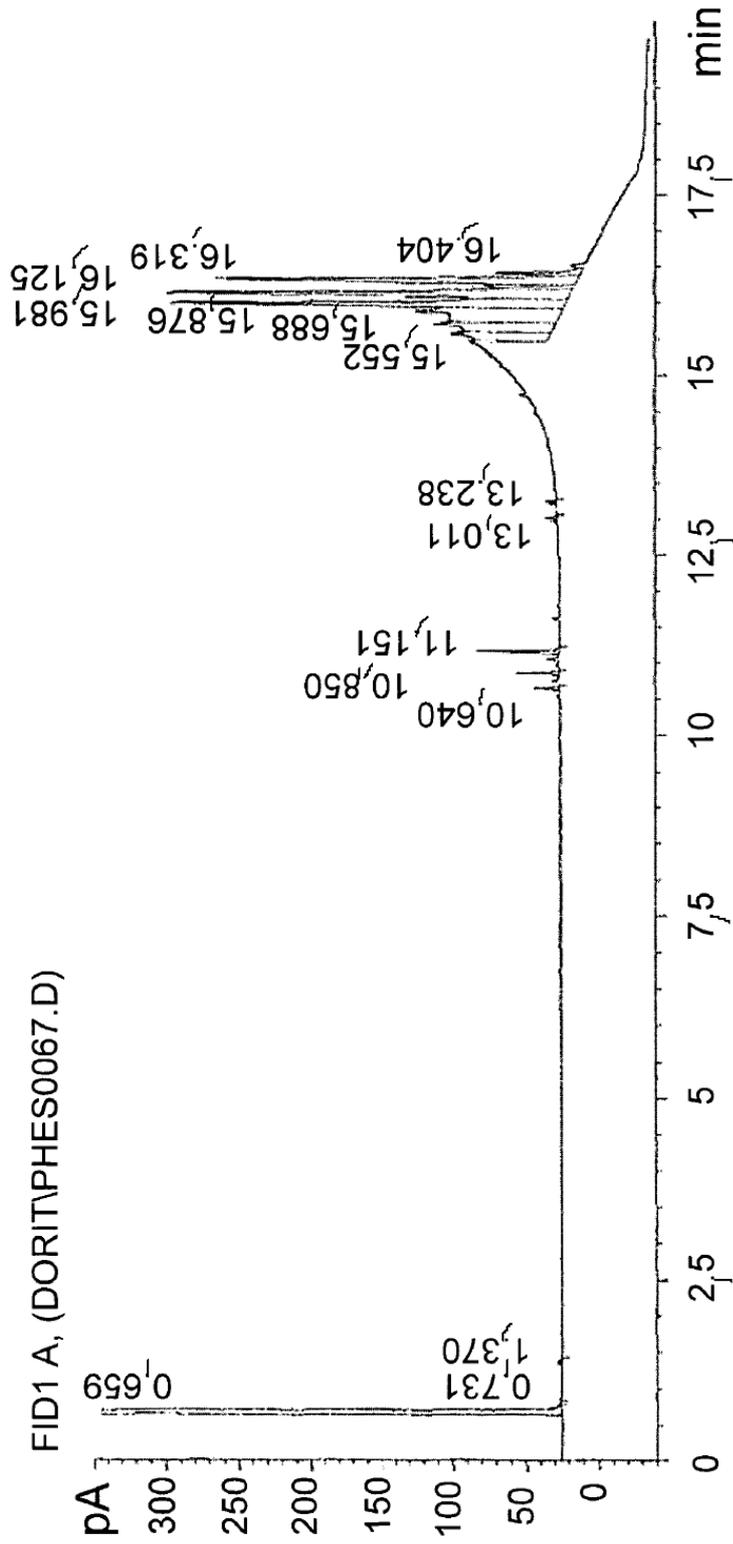


Fig. 7

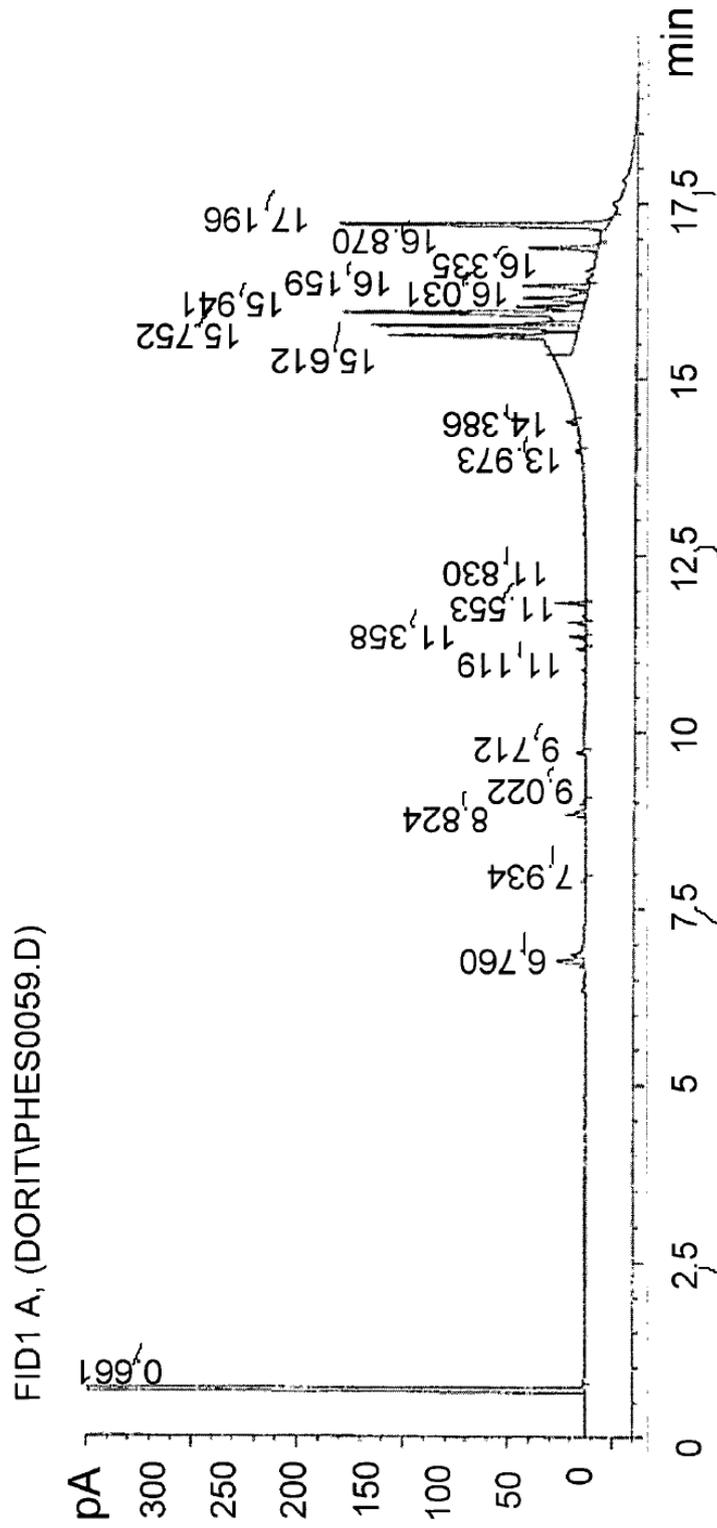


Fig. 8

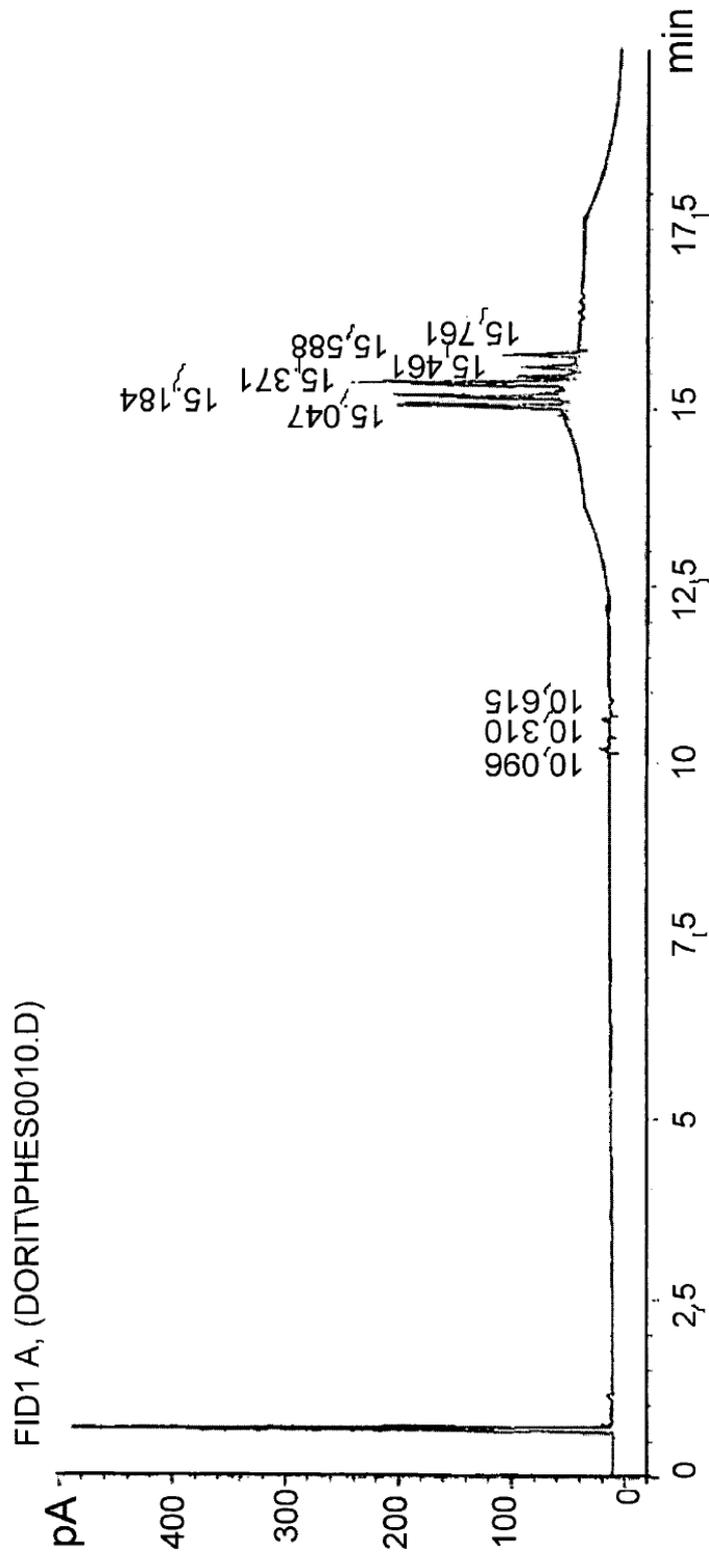


Fig. 9