

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 483**

51 Int. Cl.:

**A23K 20/158** (2006.01)  
**C12P 7/64** (2006.01)  
**C11B 1/10** (2006.01)  
**C12N 1/12** (2006.01)  
**A23L 33/115** (2006.01)  
**A61K 36/02** (2006.01)  
**A61K 8/92** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.10.2009 PCT/NL2009/000192**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **08.04.2010 WO10039030**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2009 E 09737174 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2017 EP 2337857**

54 Título: **Extracto de microalgas que contiene ácidos grasos omega 3-poliinsaturados y método para extraer aceite de microorganismos**

30 Prioridad:

**02.10.2008 EP 08165766**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**19.07.2017**

73 Titular/es:

**GONZALEZ RAMON, NIEVES (100.0%)**  
**Oude Delft 91C**  
**2611 BD Delft, NL**

72 Inventor/es:

**WEBER, ANDREAS y**  
**GONZALEZ RAMON, NIEVES**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

ES 2 625 483 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

Extracto de microalgas que contiene ácidos grasos  $\omega$ 3-poliinsaturados y método para extraer aceite de microorganismos

5

## CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a un extracto de microalgas que contiene ácidos grasos  $\omega$ 3-poliinsaturados seleccionados del grupo consistente en ácido eicosapentanoico (EPA), ácido docosaheptaenoico (DHA) y combinaciones de los mismos.

10

[0002] La invención también proporciona procesos para la extracción de una fase oleosa de biomasa húmeda de microorganismos, por ejemplo, de biomasa húmeda de microalgas.

15

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0003] Ácido eicosapentanoico (EPA; 20:5n-3) y ácido docosaheptaenoico (DHA, 22:6n-3) son ácidos grasos  $\omega$ 3-poliinsaturados que son activos metabólicamente.

20

Un gran número de estudios científicos han producido datos que sugieren que EPA y/o DHA son beneficiosos en la prevención y tratamiento de una variedad de condiciones médicas, incluyendo cardiopatía coronaria, agregación de plaquetas en sangre, niveles de colesterol anormales etc.

[0004] EPA y/o DHA pueden provenir de aceite de pescado, por ejemplo, aceite de pescado de hígado de bacalao, sardina arenque, arenque americano, atún, pez saurio y mójol.

25

Sin embargo, el aceite de pescado fluctúa en cuanto a precio y calidad.

Además, hay intereses con relación a la contaminación del aceite de pescado con pesticidas y metales pesados.

Así, hay un creciente interés en otra fuente natural de los anteriormente mencionados ácidos grasos  $\omega$ 3, es decir microalgas.

30

[0005] La extracción de  $\omega$ 3-PUFA de microalgas plantea un gran desafío.

Típicamente, bioseparación de  $\omega$ 3-PUFA de microalgas implica eliminación de insolubles, aislamiento de productos, purificación y pulido.

35

La primera fase en la recuperación posterior de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de microalgas es la extracción.

La extracción debería ser rápida, eficaz y suave para reducir la degradación de los lípidos o ácidos grasos.

Como se explica por Robles Medina et al. (Biotechnology Advances, Vol. 16, No. 3, (1998), 517-580): "Los solventes de extracción deberían ser económicos, volátiles (para eliminación más tarde), libre de impurezas tóxicas o reactivas (para evitar reacción con los lípidos), capaz de formar un sistema bifásico con agua (para eliminar no lípidos), y ser extractores pobres de componentes no deseados (por ejemplo, proteolípidos, moléculas pequeñas).

40

[0006] Diferentes técnicas de extracción de solvente para el aislamiento de  $\omega$ 3-PUFA de microalgas se han descrito en la técnica anterior. Frecuentemente, la biomasa de microalgas está sujeta a rotura celular antes de ser contactada con el solvente de extracción para maximizar la recuperación de productos intracelulares.

45

La rotura celular se puede conseguir por homogeneización de alta presión, agitación en presencia de vidrio y perlas cerámicas en molinos de esferas, ultrasonidos, lisis química o por trituración de la biomasa seca.

En procesos comerciales la biomasa de microalgas liofilizada seca se usa normalmente como una materia prima para el proceso de extracción de solvente ya que produce altos rendimientos de extracción.

50

[0007] Se conoce en la técnica que hexano, cloroformo, éter dietílico y etanol pueden extraer  $\omega$ 3-PUFA tal como EPA y DHA.

Solventes apolares tales como cloroformo, hexano o éter dietílico ofrecen la ventaja de que contaminantes no lipídicos difícilmente se disuelven en estos solventes.

55

Sin embargo, estos solventes apolares no extraen completamente lípidos polares (por ejemplo, fosfátidos y glicolípidos) debido a su solubilidad limitada en estos solventes.

Para optimizar rendimientos de extracción, experimentos han sido conducidos con una variedad de mezclas de solvente, por ejemplo, hexano/etanol, hexano-isopropanol y cloroformo/metanol/agua.

El etanol es capaz de extraer  $\omega$ 3-PUFA de microalgas en rendimientos relativamente altos.

60

Sin embargo, etanol también extraerá agua y una gama amplia de componentes polares.

Esta es la razón por la que se ha defendido someter los extractos de etanol a otra extracción de solvente con un solvente apolar o una fase de aislamiento (por ejemplo, cromatografía) para separar una fracción enriquecida con lípidos.

[0008] A.R. Fajardo et al. (Eur. J. Lipid Sci. Tehcnol. 109 (2007) 120-126) describe un método para la extracción de lípidos de microalgas (*Phyaeodactylum tricornutum*) comprendiendo las etapas siguientes:

- combinar biomasa liofilizada con etanol y agitar durante 24 horas a temperatura ambiente;
- filtración para producir un extracto crudo;
- 5     • adición de agua y hexano al extracto crudo para producir un sistema bifásico; y
- separación del sistema bifásico en una fase hexánica y una fase hidroalcohólica.

[0009] Métodos existentes para el aislamiento de  $\omega$ 3-PUFA de microalgas sufren un número de inconvenientes.

10    Ante todo, muchos si no todos estos métodos emplean solventes apolares tales como hexano, cloroformo o éter dietílico.

La manipulación de estos solventes plantea un riesgo para la seguridad ya que estos son altamente explosivos y/o tóxicos.

15    Además, estos solventes apolares deben ser esencialmente completamente quitados del producto final ( $\omega$ 3-PUFA que contienen aceite), ya que solo niveles bajos de estos solventes se permiten en ingredientes alimenticios.

[0010] Otro inconveniente de métodos de aislamiento existentes reside en su complejidad, sobre todo el número de etapas de aislamiento empleadas y/o la necesidad para derivación de  $\omega$ 3-PUFA que contienen lípidos.

20

[0011] EP-A 1 178 118 describe un proceso para obtener un aceite de células microbianas, el proceso comprende:

- a) interrumpir las paredes celulares de las células microbianas para liberar el aceite; y
- 25    b) separar el aceite de al menos parte del detrito de pared celular formado en (a).

[0012] Los ejemplos de esta solicitud de patente europea describen procesos donde un hongo (*Mortierella alpina*) y un alga (*Crypthecodinium cohnii*) se interrumpen por homogeneización de alta presión, seguido de centrifugación que produce una capa superior oleosa y una capa acuosa inferior con el detrito celular.

30

#### RESUMEN DE LA INVENCION

[0013] Los presentes inventores han diseñado procesos alternativos para el aislamiento de  $\omega$ 3-PUFA de microalgas que evitan al menos algunos de los inconvenientes anteriormente mencionados.

35

Los procesos según la presente invención comienzan a partir de biomasa de microalgas húmeda, no requiere el uso de solventes orgánicos apolares y produce un extracto bifásico que puede fácilmente ser procesado posteriormente para producir aceite que contiene  $\omega$ 3-PUFA con un rendimiento elevado o que se puede utilizar como tal, por ejemplo, en la producción de pienso para animales.

40

El extracto bifásico obtenido por los presentes procesos comprende una fase oleosa y una fase acuosa que juntas contienen esencialmente todo el material lipídico que fue originalmente contenido en la biomasa húmeda, es decir lípidos apolares (por ejemplo, triglicéridos, ácidos grasos libres) y lípidos polares (por ejemplo, glicolípidos, fosfolípidos).

[0014] Así, un aspecto de la presente invención se refiere a un extracto de microalgas bifásicas que incluye una fase acuosa y una fase oleosa, dicho extracto siendo caracterizado por el hecho de que contiene:

45

- 40-100% en peso de la fase oleosa de lípidos seleccionados de triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos, fosfátidos, ácidos grasos libres y combinaciones de los mismos;
- 0,01-10% en peso de carotenoides de la fase oleosa;
- 0,5-10% en peso de cloruro sódico de la fase acuosa;
- 50     • 0-3 % en peso de material no disuelto diferente de las gotitas dispersas de fase acuosa o fase oleosa; y
- 0-10% en peso de monoalcohol C<sub>1-5</sub> de la fase acuosa.

[0015] Otro aspecto de la invención se refiere a un proceso de extracción de una fase oleosa a partir de un extracto bifásico como se ha descrito anteriormente, dicho proceso que comprende:

55

- combinar biomasa de microalgas húmeda con una preparación enzimática teniendo actividad celulasa,  $\beta$ -glucanasa o  $\beta$ -glucosidasa;

- permitir a la preparación enzimática degradar las paredes celulares de las microalgas;

60

- aislar desde la biomasa tratada con enzimas al menos 20% en peso de un líquido de la biomasa de microalgas húmeda, dicho líquido siendo un extracto bifásico comprendiendo 50-90 % en peso de una fase acuosa y 5-50 % en peso de una fase oleosa; y

- separar la fase oleosa desde la fase acuosa.

#### DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

65

- [0016] Por consiguiente, un primer aspecto de la invención se refiere a un extracto de microalgas bifásicas que comprende 15-95 % en peso de una fase acuosa y 5-85 % en peso de una fase oleosa, dicho extracto que contiene al menos 1% en peso de ácidos grasos totales de ácidos grasos  $\omega$ 3 seleccionados del grupo que consiste en ácido eicosapentanoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA) y combinaciones de los mismos, dicho extracto además estando caracterizado por el hecho de que contiene:
- 40-100% en peso de la fase oleosa de lípidos seleccionados de triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos, fosfátidos, ácidos grasos libres y combinaciones de los mismos;
  - 0,01-10% de carotenoides en peso de la fase oleosa;
  - 0,5-10% de cloruro sódico en peso de la fase acuosa;
  - 0-3 % en peso de material no disuelto diferente de las gotitas dispersas de fase acuosa o fase oleosa; y
  - 0-10% en peso de monoalcohol  $C_{1-5}$  de la fase acuosa.
- [0017] El término "extracto bifásico" como se utiliza en este caso se refiere a un extracto que comprende al menos una fase acuosa y una fase oleosa. Así, el término "extracto bifásico" también abarca emulsiones que comprenden tres o más fases, por ejemplo, una emulsión de agua-en-aceite-en-agua o una emulsión que contiene otra fase que es inmisible con la fase acuosa o la fase oleosa. Preferiblemente, el extracto bifásico esencialmente consiste en dos fases separadas, es decir la fase acuosa y la fase oleosa.
- [0018] Siempre que se hace referencia aquí a una concentración de ácido graso, a menos que se indique lo contrario, dicha concentración se calcula en peso de la cantidad total de ácidos grasos, incluyendo ácidos grasos libres y ácidos grasos contenidos en los ésteres de ácido graso tal como glicérido y ésteres de fosfato.
- [0019] Según una forma de realización particularmente preferida, el extracto de microalgas bifásicas comprende 20-90 % en peso de una fase acuosa y 10-80 % en peso de una fase oleosa. De la forma más preferible, el extracto de microalgas bifásicas comprende 30-85 % en peso de una fase acuosa y 15-70 % en peso de una fase oleosa.
- [0020] La fase oleosa del presente extracto bifásico contiene preferiblemente 50-100%, más preferiblemente 70-100%, y de la forma más preferible 85-100% en peso de la fase oleosa de lípidos seleccionados de triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos, fosfátidos, ácidos grasos libres y combinaciones de los mismos.
- [0021] El extracto bifásico de la presente invención contiene típicamente una cantidad considerable de carotenoides, por ejemplo, al menos 0,03-5%, más preferiblemente al menos 0,1% y de la forma más preferible al menos 0,3% de carotenoides en peso de la fase oleosa. Típicamente, la cantidad de carotenoides contenida en el extracto no excederá 5 % en peso. Preferiblemente, el contenido de carotenoide no excede 3 % en peso. Asimismo, el extracto contiene normalmente una cantidad considerable de cloruro sódico. Típicamente, el extracto bifásico contiene 0,7-6%, más preferiblemente 0.8-4% en peso de cloruro sódico de la fase acuosa;
- [0022] Los beneficios de la presente invención son particularmente pronunciados en el caso de que una fracción significativa de los ácidos grasos  $\omega$ 3 sea contenida en la fracción lipídica polar, en particular si una fracción significativa es contenida en fosfátidos (por ejemplo, fosfatidilcolina y/o fosfatidiletanolamina) y/o glicolípidos. Según una forma de realización preferida al menos 10 % en peso, más preferiblemente al menos 20 % en peso y de la forma más preferible al menos 25 % en peso de los ácidos grasos  $\omega$ 3 es contenido en lípidos polares seleccionados de fosfátidos, glicolípidos y combinaciones de los mismos.
- [0023] Ventajosamente, el presente extracto contiene 3-50%, más preferiblemente 5-40% en peso de los anteriormente mencionados lípidos polares de la fase oleosa. Aún más preferiblemente, el presente extracto contiene 3-50%, de la forma más preferible 5-40% en peso de fosfátidos de la fase oleosa.
- [0024] En una forma de realización preferida de la presente invención el extracto bifásico se produce mediante extracción con un solvente con un alto contenido de monoalcohol  $C_{1-5}$ , seguido de eliminación del volumen de dicho alcohol mediante evaporación. Normalmente, una pequeña cantidad del monoalcohol  $C_{1-5}$  será retenida en el extracto bifásico. Típicamente, el extracto contiene 0,01-10%, más preferiblemente 0,03-10%, aún más preferiblemente 0,1-10%, y de la forma más preferible 0,1-5% de monoalcohol  $C_{1-5}$  en peso de la fase acuosa. Preferiblemente, el monoalcohol  $C_{1-5}$  es seleccionado del grupo seleccionado de metanol, etanol, isopropanol y combinaciones de los mismos. De la forma más preferible, el monoalcohol  $C_{1-5}$  es etanol.

[0025] Como se ha explicado aquí anteriormente, la presente invención proporciona la ventaja importante de que ésta no depende del uso de solventes orgánicos apolares.

Por lo tanto, según una forma de realización particularmente preferida, el extracto contiene menos del 0,1 % en peso, aún más preferiblemente menos del 0,03 % en peso de solventes orgánicos diferentes del monoalcohol C<sub>1-5</sub>.

[0026] Los beneficios de la presente invención se pueden realizar utilizando todos los tipos de microalgas, siempre que contengan cantidades significativas de EPA y/o DHA.

Según una forma de realización preferida, las microalgas empleadas conforme a la presente invención no son especies de secreción de silicato o de calcio que pertenecen a los diátomos o al género coccolitóforos.

Ejemplos de género/clases de microalgas que pueden idóneamente ser empleados incluyen *Chysophyceae*, *Xantophyceae*, *Eustigmatophyceae*, *Baccilariophyceae*, *Dinophyceae*, *Rodophyceae*, *Phaeophyceae*, *Chlorophyceae*, *Prasinophyceae*, *Cryptophyceae*, *Botryococcus*, *Isochrysis*, *Tetraselmis*, *Neochloris*, *Scenedesmus*, *Chlorobotrys*, *Eustigmatos*, *Pseudostaurastrum*, *Vischeria*, *Monodopsis*, *Ellipsoidion*, *Pseudocharaciopsis* y combinaciones de los mismos.

Aún más preferiblemente, las microalgas empleadas, pertenecen a un género o clase seleccionado de *Eustigmatophyceae*, *Chlorophyceae* y combinaciones de los mismos.

De la forma más preferible, las microalgas empleadas conforme a la presente invención son seleccionadas de *Nannochloropsis gaditana*, *Isochrysis galbana*, *Chlorella fusca*, *Haematococcus pluvialis* y combinaciones de los mismos.

[0027] Las microalgas empleadas conforme a la presente invención preferiblemente son microalgas verdes.

Por consiguiente, en una forma de realización preferida, el extracto contiene al menos 0,02%, más preferiblemente 0,05% en peso de clorofila de la fase oleosa.

Normalmente, la concentración de clorofila del extracto no excede 1% en peso de la fase oleosa.

[0028] El extracto bifásico de la presente invención puede adecuadamente ser producido por extracción de la biomasa húmeda con un monoalcohol C<sub>1-5</sub>, seguido de evaporación del volumen de dicho monoalcohol.

Tal extracto bifásico se caracteriza porque puede ser disuelto completamente nuevamente en el monoalcohol C<sub>1-5</sub> que fue usado el solvente de extracción.

Así, conforme a esta forma de realización de la invención, ventajosamente 200 gramos del extracto pueden ser completamente disueltos en 1 litro de monoalcohol C<sub>1-5</sub>.

[0029] Alternativamente, el extracto bifásico de la invención se puede producir hidrolizando enzimáticamente los componentes de pared celular húmeda de biomasa de microalgas, seguido de eliminación de material no soluble.

Tal extracto bifásico contiene típicamente al menos 1%, preferiblemente al menos 3% en peso de material de pared celular de algas celulósicas hidrolizadas de sustancia seca.

Mejores resultados se obtienen según esta forma de realización si una fracción grande de la celulosa contenida en la biomasa de microalgas originales es hidrolizada.

Ventajosamente, al menos 50%, más preferiblemente al menos 80% de la celulosa contenida en el extracto es celulosa hidrolizada.

[0030] Preferiblemente, la fase acuosa y la fase oleosa del presente extracto bifásico contienen menos del 1 % en peso de material no disuelto además de las gotitas dispersas de la otra fase.

Niveles bajos de material no disuelto son deseables ya que facilitan la recuperación posterior de los  $\omega$ 3-PUFA, EPA y DHA.

[0031] Típicamente, la fase acuosa y la fase oleosa del presente extracto bifásico juntas representan al menos 80 % en peso, preferiblemente al menos 90 % en peso y de la forma más preferible al menos 98 % en peso del extracto.

[0032] Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de extracción de una fase oleosa de microalgas que contienen paredes celulares, dicha fase oleosa que contiene al menos 1% en peso de ácidos grasos totales de ácidos grasos  $\omega$ 3 seleccionados de EPA, DHA y combinaciones de los mismos, el proceso que comprende:

- combinar la biomasa de microalgas húmeda con los ácidos grasos  $\omega$ 3 con una preparación enzimática teniendo actividad celulasa,  $\beta$ -glucanasa o  $\beta$ -glucosidasa;
- permitir a la preparación enzimática degradar las paredes celulares de las microalgas;
- aislar de la biomasa tratada con enzimas al menos 20% en peso de un líquido de la biomasa de microalgas húmeda, dicho líquido siendo un extracto bifásico comprendiendo 50-95 % en peso de una fase acuosa y 5-50 % en peso de una fase oleosa; y
- separar la fase oleosa de la fase acuosa.

[0033] El término "biomasa húmeda" como se utiliza en este caso se refiere a biomasa que contiene al menos 10 % en peso de agua.

Preferiblemente, la biomasa húmeda contiene al menos 30 % en peso de agua y de la forma más preferible más del 50 % en peso de agua.

5 Los presentes procesos ofrecen la ventaja importante de que usan biomasa húmeda como una materia prima lo que significa que etapas de secado pueden ser evitadas.

El secado de la biomasa no solo tiene la desventaja de que consume grandes cantidades de energía, pero también tiene el inconveniente importante de que promueve la oxidación de los  $\omega$ -3 PUFAs contenidos en la biomasa.

10

[0034] Según una forma de realización particularmente preferida del proceso definido anterior, la preparación enzimática se combina con la biomasa en una cantidad suficiente para proporcionar al menos 1 UI por gramo de sustancia seca de biomasa de actividad de endoglucanasa y/o al menos 0,2 UI por gramo de sustancia seca de biomasa de unidades de  $\beta$ -glucanasa y/o al menos 0,8 UI por gramo de sustancia seca de biomasa de actividad  $\beta$ -glucosidasa.

15

La actividad de endoglucanasa es determinada usando un ensayo de carboximetilcelulosa (CMC) basado en microplaca como se describe por Xiao et al (Analytical Biochemistry, 342 (2005), 176-178).

Una UI de actividad de endoglucanasa es definida como la cantidad de enzima que libera un micromol de azúcares reductores (expresada como equivalente de glucosa) en 1 minuto a 50 °C y pH 4.8.

20

Una UI de actividad  $\beta$ -glucanasa es definida como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu$ mol de equivalentes de azúcar reductor (expresado como glucosa) por minuto a 55 °C y pH 5.0, usando  $\beta$ -D-glucano como sustrato.

De forma similar, una UI de actividad  $\beta$ -glucosidasa es definida como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu$ mol de nitrofenol para-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranososa en 10 minutos a condiciones de ensayo específicas a 50 °C y pH 4.8.

25

[0035] La degradación enzimática de las paredes celulares de las microalgas conforme al procedimiento anteriormente descrito ofrece la ventaja de que resulta innecesario aplicar rotura mecánica, sobre todo condiciones de alta cizalladura, para lisar las células.

30

Así, en una forma de realización particularmente preferida de este proceso la biomasa de microalgas húmeda no se somete a rotura mecánica antes del aislamiento del líquido bifásico.

Aún más preferiblemente, la biomasa de microalgas húmeda no se somete a homogeneización de alta cizalla, aún incluso no se somete a homogeneización de alta cizalla a presiones de 100 bar o más.

De la forma más preferible, la biomasa de microalgas húmeda no se somete a homogeneización de alta cizalla a presiones de 80 bar o más.

35

[0036] La biomasa húmeda empleada en este proceso típicamente tiene un contenido de agua de 10-95 % en peso.

Más preferiblemente, la biomasa húmeda empleada en los procesos según la presente invención tiene un contenido de agua de 15-80 % en peso.

40

[0037] En el proceso definido anterior un extracto bifásico se produce desde el cual una fase oleosa se aísla por su separación de una fase acuosa.

La separación de la fase oleosa se puede conseguir en formas diferentes.

45

Según una forma de realización particularmente preferida, la fase oleosa es separada de la fase acuosa por centrifugación y/o decantación.

De la forma más preferible, la fase oleosa se separa por decantación.

La fase oleosa aislada obtenida por el presente proceso se puede someter a etapas de procesamiento adicionales para eliminar impurezas y para mejorar la concentración de EPA y/o DHA.

50

Técnicas de procesamiento adecuadas para eliminar impurezas y/o concentrar EPA y/o DHA se conocen en la técnica.

[0038] Conforme a otra forma de realización preferida, la biomasa de algas contiene al menos 75 % en peso de biomasa de microalgas verdes, preferiblemente al menos 75 % en peso de biomasa de microalgas de un género de microalgas o clase de microalgas seleccionada de *Chrysophyceae*, *Xanthophyceae*, *Bacillariophyceae*, *Dinophyceae*, *Rhodophyceae*, *Phaeophyceae*, *Chlorophyceae*, *Prasinophyceae*, *Cryptophyceae*, *Botryococcus*, *Isochrysis*, *Tetraselmis*, *Neochloris*, *Scenedesmus*, *Chlorobotrys*, *Eustigmatos*, *Pseudostaurastrum*, *Vischeria*, *Monodopsis*, *Ellipsoidion*, *Pseudocharaciopsis* y combinaciones de los mismos.

55

60

[0039] Ventajosamente, los presentes procesos no emplean ningún solvente orgánico diferente del monoalcohol  $C_{1-5}$ .

De la forma más preferible dichos procesos no emplean ningún solvente orgánico diferente del etanol.

65

[0040] El extracto bifásico producido en los procesos anteriormente mencionados es ventajosamente un extracto bifásico tal y como se define aquí antes.

[0041] Otro aspecto de la invención concierne el uso del extracto bifásico de la presente invención en la producción de productos alimenticios, bebidas, preparaciones nutricionales, productos farmacéuticos, pienso para animales o productos cosméticos.

5 Los extractos bifásicos y la fase oleosa aislada son particularmente adecuados para usar en pienso para animales ya que el extracto o fase oleosa aislada se pueden incorporar en el pienso para animales sin necesidad de ningún pretratamiento.

Consecuentemente, en una forma de realización particularmente preferida, el extracto bifásico o la fase oleosa extraída del mismo se usa en la producción de pienso para animales.

10 [0042] Típicamente, el presente uso comprende incorporar el extracto bifásico o la fase oleosa en una cantidad que es equivalente a al menos 0,1% en peso del producto final.

[0043] La invención es posteriormente ilustrada mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

15 **EJEMPLOS**

Ejemplo 1

20 [0044] Biomasa de microalgas húmeda (*Nannochloropsis*) fue extraída con etanol. La cepa *nannochloropsis* usada fue:

- *Nannochloropsis gaditana* Lubian (1982); División: *Heterokontophyta*, Clase: *Eustigmatophyceae*. CCAP 849/5 de la colección de cultivos de algas y protozoos (CCAP)
- Aislador: Lubian (pre 1977); origen: Marino; Bahía de Cadiz, Cadiz, España
- 25 Cultivo: Medium SNA; A; sub

[0045] Microalgas de *Nannochloropsis* fueron cosechadas en su fase de crecimiento exponencial y la suspensión de células fue centrifugada para la eliminación de agua en exceso y sales con una centrífuga del tipo alfa Laval CLARA 80.

30 Cien gramos de la biomasa húmeda así obtenida fueron extraídos con 200 g de etanol puro (99,9%) por la agitación de la mezcla de biomasa y etanol durante 1 hora a temperatura ambiente utilizando un matraz de Erlenmeyer con un agitador magnético y tapón de vidrio.

El extracto fue filtrado por succión con la ayuda de un embudo de Büchner y el retenido fue lavado dos veces con 50 g de etanol en total.

35 Después, más del 99 % en peso del etanol fue quitado del filtrado utilizando un evaporador rotatorio (65 °C, 200 mbar).

Después de la evaporación, el extracto se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente.

En esta fase, la separación de fase ocurrió, produciendo un extracto bifásico que comprende:

- i. 73 % en peso de una fase inferior acuosa que contiene principalmente sales y componentes glucídicos; y
- 40 ii. 27 % en peso de una fase superior oleosa con un punto de fusión de aproximadamente 30 °C.

[0046] La fase oleosa fue separada desde la fase acuosa mediante decantación.

La cantidad total de material extraído resultó en 32 % en peso de la biomasa original (material seco).

45 El análisis mostró que la fase superior de lípido contenía 5.5 % en peso de ácido eicosapentanoico (EPA).

[0047] El análisis de GC además mostró que el ácido palmítico, ácido esteárico y ácido oleico fueron los ácidos grasos principales, juntos representando 60-70 % en peso de los ácidos grasos contenidos en la fase oleosa.

50 [0048] Una muestra de la fase oleosa aislada fue sometida a un análisis de lípidos utilizando una columna de vidrio conteniendo 3 g de gel de sílice 60 en 5 ml de cloroformo.

Con este fin 0.1030 g de la fase oleosa en 2-3 ml de cloroformo se aplicó sobre la columna, seguido de elución con:

- 100 ml de cloroformo para eluir lípidos neutros (esteroles, triglicéridos, ácidos grasos);
- 150 ml de acetona: metanol (9:1) para eluir glicolípidos (cerebrósidos, sulfátidos, mono- y digalactosil diglicéridos, glucósidos de esteroles) y ceramidas y finalmente
- 100 ml de metanol para eluir fosfolípidos.

60 [0049] La composición de la fase oleosa resultó ser de la siguiente manera:

LÍPIDOS NEUTROS	47.05 % en peso.
GLICOLÍPIDOS Y CERAMIDAS	26.22 % en peso.
FOSFOLÍPIDOS	26.73 % en peso

65 [0050] Además, se ha observado que la fase oleosa contenía 2,71 % en peso de colesterol y 1285 mg/kg de caroteno.

Ejemplo 2

5 [0051] El retenido obtenido desde el embudo de Büchner después de la extracción descrita en el Ejemplo 1 fue sometido a otra extracción con 200 g de etanol puro (99,9%) a temperatura ambiente por la agitación de la mezcla de extracción durante 1 hora en un matraz de Erlenmeyer con un agitador magnético y tapón de vidrio.

El extracto fue filtrado por succión con la ayuda de un embudo de Büchner y el retenido fue lavado dos veces con 50 g de etanol en total.

10 Después, el etanol fue quitado del filtrado utilizando un evaporador rotatorio (65 °C, 200 mbar) y se dejó enfriar a temperatura ambiente, produciendo un extracto oleoso.

[0052] La cantidad total de material extraído durante la segunda extracción resultó en 5,9 % en peso de la biomasa original.

15 El análisis además mostró que el extracto obtenido en la segunda extracción contenía 5,1 % en peso de EPA. El análisis de GC además mostró que la composición de ácido graso del segundo extracto fue esencialmente idéntica a la del primer extracto.

[0053] El retenido de la segunda extracción fue extraído dos veces con una mezcla de cloroformo y metanol para eliminar cualquier material lipídico residual contenido en ésta.

La cantidad total de lípidos extraída con esta mezcla de solvente fue 4,3% en peso de la masa extraída.

El contenido EPA de los lípidos extraídos fue 1,7 % en peso.

La cantidad total de EPA quitada de la biomasa húmeda por las dos extracciones de etanol y la extracción de cloroformo/metanol fue 13,4% en peso de sustancia seca.

25 Este porcentaje iguala la cantidad de EPA normalmente encontrada en *Nannochloropsis*.

[0054] Muestras del extracto obtenido de la primera extracción descrita en el Ejemplo 1 y del extracto obtenido de la segunda extracción fueron sometidas a cromatografía en capa fina.

30 Los cromatogramas así obtenidos mostraron que el primer extracto principalmente consistió en lípidos polares, glico- y fosfolípidos y que el segundo extracto en su mayoría consiste en triglicéridos y componentes coloreados (clorofilas).

Ejemplo 3

35 [0055] Ejemplos 1 y 2 fueron repetidos utilizando un lote diferente de biomasa húmeda de *Nannochloropsis*. La primera extracción fue encontrada para eliminar 31,3 % en peso de material extraído de la biomasa original (calculada en la sustancia seca), mientras que la segunda extracción eliminó otro 7,3 % en peso.

40 [0056] Nuevamente, la primera extracción liberó un extracto bifásico que fue separado en una fase oleosa y una fase acuosa por decantación.

La fase oleosa de la primera extracción contenía 7,3 % en peso de EPA y el extracto obtenido de la segunda extracción contenía 4,4 % en peso de EPA.

Ejemplo comparativo A

45 [0057] La misma cepa de *Nannochloropsis* como fue usada en los ejemplos 1-3 fue homogeneizada y secada mediante secado por atomización.

Posteriormente, 250 g de la biomasa seca fue sometida a extracción con dióxido de carbono supercrítico (caudal constante de 5-5,5 kg/h).

50 Durante la extracción el dióxido de carbono supercrítico fue recirculado continuamente.

Los componentes extraídos fueron quitados por la expansión del dióxido de carbono en una cámara de expansión seguido de (re)presurización del dióxido de carbono a un estado supercrítico.

Primero, la biomasa seca fue extraída con dióxido de carbono supercrítico (300 bar, 90 °C).

55 Después, el residuo de extracción fue extraído una vez más usando dióxido de carbono supercrítico (150 bar, 50 °C seguido de 300 bar, 90 °C)

[0058] En la tabla 1 las condiciones de extracción y los rendimientos de extracción son resumidos:

Tabla 1

Condiciones de extracción	Cantidad total extraída (en la masa seca)	EPA en el aceite extraído
300 bar, 90 °C, 18 h	23 % en peso	3.3 % en peso
a) 150bar, 50 °C, 5.5 h		a) 3.2 % en peso
b) 300 bar, 90 °C, 5.5 h	14 % en peso	b) 2.8 % en peso

60



[0059] Niveles de EPA en el aceite extraído fueron significativamente inferiores a aquellos encontrados en los aceites extraídos de los ejemplos 1-3.

Además se descubrió que el residuo obtenido de la segunda extracción todavía contenía una cantidad sustancial de EPA (13-16% del EPA contenido en la materia prima), a pesar de los largos tiempos de extracción empleados.

Ejemplo comparativo B

[0060] Dos lotes de la misma cepa de *Nannochloropsis* como se usó en los ejemplos 1-3 fueron homogeneizados y secados mediante secado por atomización.

Posteriormente, la biomasa seca fue extraída a temperatura ambiente con una mezcla de cloroformo y metanol usando un método Blight and Dyer.

La biomasa húmeda (20 gramos) fue mezclada con una mezcla de cloroformo/metanol (75 ml) 1:2 (p/p) en un matraz de Erlenmeyer y agitada enérgicamente durante 3 minutos.

Después, 20 ml de cloroformo y 20 ml de agua fueron adicionados, seguido de 3 horas de agitación.

La mezcla fue transferida a un decantador donde la separación de fase fue dejada ocurrir durante un periodo de dos horas.

La fase (clorofórmica) inferior fue recuperada y el solvente orgánico fue eliminado utilizando un evaporador rotatorio.

La Tabla 2 resume los rendimientos de extracción así obtenidos para cada lote de *Nannochloropsis*:

Tabla 2

Cantidad Total extraída (en la masa seca)	EPA en el aceite extraído
24,6 % en peso	6,0 % en peso
20,0 % en peso	3,2 % en peso

[0061] La extracción con la mezcla de cloroformo/metanol produce altos rendimientos de EPA.

Sin embargo, como tanto el cloroformo como el metanol son tóxicos, se necesita tomar precauciones de seguridad estrictas durante la extracción y se requiere un procesamiento posterior complejo para reducir niveles de solvente residuales a niveles que son considerados aptos para uso alimentario.

Ejemplo comparativo C

[0062] Dos lotes de la misma cepa de *Nannochloropsis* como se usaron en los Ejemplos 1-3 fueron homogeneizados y secados mediante secado por atomización.

Posteriormente, la biomasa seca (15 g) fue sometida a extracción con 300 ml de hexano en un extractor Soxhlet a 80 °C durante 12 horas.

La Tabla 3 resume los rendimientos de extracción así obtenidos para cada lote de *Nannochloropsis*:

Tabla 3

Cantidad Total extraída (en la masa seca)	EPA en el aceite extraído
25,4 % en peso	3,9 % en peso
23,2 % en peso	3,9 % en peso

[0063] La extracción de hexano produjo un rendimiento de lípido muy alto, pero el nivel de EPA en los aceites extraídos son considerablemente inferiores a aquellos encontrados en los aceites extraídos de ejemplos 1-3.

Además, se ha observado que una alta proporción del EPA fue retenida en el residuo de extracción (aproximadamente 20%), a pesar de los tiempos de extracción largos empleados.

Ejemplo 4

[0064] El ejemplo 1 fue repetido excepto que esta vez la biomasa de microalgas de *Chorella fusca* (División: Scenedesmus, origen: agua dulce) fue extraída con etanol.

La biomasa de microalgas usada (ej Source Ingrepro BV, Países Bajos) fue suministrada en la forma seca y fue reconstituida con agua de mar (1:1) antes de la extracción.

Según especificación, la biomasa seca tiene un contenido lipídico de 6-20%, dependiendo de la estación de cosecha.

[0065] Después de la evaporación en un evaporador rotatorio y enfriamiento posterior a temperatura ambiente, un extracto bifásico se obtuvo que contenía 26 % en peso de fase oleosa y 74 % en peso de fase acuosa.

Se encontró que la extracción eliminó 26,4 % en peso de material extraído de la biomasa original (calculada en el material seco).

[0066] El análisis de GC mostró que ácido palmítico, ácido esteárico y ácido oleico fueron los ácidos grasos principales, juntos representando 60-70 % en peso de los ácidos grasos contenidos en la fase oleosa. Una muestra de la fase oleosa aislada fue sometida al mismo análisis de lípidos como se describe en el ejemplo 1.

5

[0067] La composición de la fase oleosa resultó ser de la siguiente manera:

LÍPIDOS NEUTROS 47 % en peso.  
GLICOLÍPIDOS Y CERAMIDAS 26 % en peso.  
FOSFOLÍPIDOS 27 % en peso

10

Ejemplo 5

[0068] El ejemplo 4 fue repetido, excepto que esta vez en vez de etanol puro una mezcla 9:1 de etanol y hexano fue usada.

15

Después de la evaporación en un evaporador rotatorio y enfriamiento posterior a temperatura ambiente, un extracto bifásico se obtuvo que contenía 31 % en peso de fase oleosa y 69 % en peso de fase acuosa. Se descubrió que la extracción eliminó 27,4 % en peso de material extraído desde la biomasa original (calculado en el material seco).

20

Ejemplo 6

[0069] La cepa de *Nannochloropsis* de los ejemplos 1-3 fue sometida a un proceso de extracción de aceite alternativo implicando tratamiento enzimático de la biomasa húmeda.

25

Microalgas de *Nannochloropsis* fueron cosechadas en su fase de crecimiento exponencial y la suspensión de células fue centrifugada para la eliminación de agua en exceso y sales con una centrifuga del tipo Alfa Laval CLARA 80.

Cien gramos de la biomasa húmeda así obtenidos fueron introducidos en un matraz de Erlenmeyer y el pH fue ajustado con tampón acetato a 4,5.

30

Después, una preparación enzimática fue añadida e íntegramente mezclada con la biomasa.

La mezcla resultante fue mantenida a 50 °C con la ayuda de un baño maría y agitada suavemente.

Las suspensiones celulares así obtenidas fueron filtradas por Papel de Filtro Waltman® estándar para eliminar detrito celular y posteriormente sometidas a centrifugación moderada (10 minutos a 2000G).

En cualquier caso la centrifugación liberó un extracto bifásico conteniendo una fase acuosa y una fase oleosa.

35

[0070] La Tabla 4 especifica las preparaciones enzimáticas y condiciones que fueron usadas al igual que el contenido EPA de la fase oleosa:

Tabla 4

Enzima digestiva	Cantidad de enzima añadida	Condiciones	EPA en fase oleosa
Accelerase® 1000	0.05 ml por gramo de biomasa	1 hora a 50 °C	6.2%
Accelerase® 1000	0.05 ml por gramo de biomasa	5 horas a 50 °C	6.3%
Viscozyme® L	1% en peso de biomasa seca	6 horas a 50 °C	7.3%
Celluclast® BG	1% en peso de biomasa seca	6 horas a 50 °C	7.4%
Viscozyme® L + Celluclast® BG	1% en peso de biomasa seca	6 horas a 50 °C	8.9%

40

Ejemplo 7

[0071] La biomasa de las siguientes especies de microalgas fue extraída con etanol:

45

- *Nannochloropsis gaditana* Lubian (1982); dDivisión: *Heterokontophyta*, Clase: *Eustigmatophyceae*. CCAP 849/5 de la colección de cultivos de algas y protozoos (CCAP). Aislador: Lubian (pre 1977). Origen: Marino; Bahía de Cadiz, Cadiz, España. Cultivo: Medium SNA; A; sub

- *Chlorella fusca*. Source Ingrepro BV, Países Bajos, contenido de lípido medio: 6-20% dependiendo de la estación de cosecha. División: *Scenedesmus*. Origen: agua dulce

50

- *Haematococcus pluvialis* Flotow (1844), División: clorofita, clase: *Chlorophyceae*, Orden: *Volvocales*. CCAP 34/6 de la colección de cultivos de algas y protozoos (CCAP). Aislador: Droop (1951). Origen: agua dulce, embalse; Ostpicken Island, Tvärminne, Finlandia. Cultivo: medio EG:JM; A; cryo

- *Isochrysis galbana* Parke (1949), División: *Prymnesiophyta (Haptophyta)*, Clase: *Prymnesiophyciae*. CCAP 927/1 de la colección de cultivos de algas y protozoos (CCAP). Aislador: Parke (1938); origen: Marino; estanque piscícola; Port Erin Marine Station, Isle of Man, Bretaña. Cultivo: Medium f/2, A; sub

55

[0072] Las microalgas fueron cosechadas en su fase de crecimiento exponencial y la suspensión de células fue centrifugada para la eliminación de agua en exceso y sales con una centrifuga del tipo Alfa Laval CLARA 80.

5 Para las especies no marinas el contenido de sal fue ajustado para conseguir la misma concentración de sal como agua de mar.

Los lodos celulares así obtenidos fueron sometidos a secado en tambor para producir una biomasa de microalgas con un contenido de humedad de aproximadamente 50%.

[0073] Para cada especie de microalgas cien gramos de la biomasa secada en tambor fueron extraídos con 200 g de etanol puro (99,9%) por la agitación de la mezcla de biomasa y etanol durante 1 hora a temperatura ambiente utilizando un matraz de Erlenmeyer con un agitador magnético y tapón de vidrio.

Los extractos así obtenidos fueron filtrados por succión con la ayuda de un embudo de Büchner y los retenidos fueron lavados dos veces con 50 g de etanol en total.

15 Después, más de 99 % en peso de etanol fue eliminado de los filtrados utilizando un evaporador rotatorio (65 °C, 200 mbar).

[0074] Después de la evaporación, los extractos se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente.

20 En esta etapa, la separación de fase ocurrió en todas las muestras, produciendo un extracto bifásico que comprende: una fase inferior acuosa que contiene principalmente sales y componentes glicídicos; y una fase superior oleosa con un punto de fusión de aproximadamente 30 °C.

[0075] Las fases de aceite fueron separadas de las fases acuosas mediante decantación.

El análisis de estas fases de aceite produjeron los datos siguientes:

Microalgas	Lípidos #	Eicosapentaenoico (EPA) o docosahexaenoico (DHA)	Carotenoides
<i>Isochrysis galbana</i>	48,5 % en peso	1 % en peso (DHA)	1,88 % en peso
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	82,3 % en peso	5,6 % en peso (EPA)	4,1 % en peso
<i>Chlorella fusca</i>	97,5 % en peso	1,5 % en peso (EPA)	1,3 % en peso
<i>Haematococcus pluvialis</i>	96,6 % en peso	1,4 % en peso (EPA)	5 % en peso
# Lípidos = triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos, fosfátidos, ácidos grasos libres			

25

## REIVINDICACIONES

1. Extracto de microalgas bifásico que comprende 15-95 % en peso de una fase acuosa y 5-85 % en peso de una fase oleosa, dicho extracto que contiene al menos 1% en peso de ácidos grasos de ácidos grasos  $\omega$ 3  
 5 totales seleccionados del grupo consistente en ácido eicosapentanoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA) y combinaciones de los mismos, dicho extracto además estando **caracterizado por el hecho de que** contiene:
- 40-100% en peso de la fase oleosa de lípidos seleccionados de triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos, fosfátidos, ácidos grasos libres y combinaciones de los mismos;
  - 10 • 0,01-10% de carotenoides en peso de la fase oleosa;
  - 0,5-10% de cloruro sódico en peso de la fase acuosa;
  - 0-3 % en peso de material no disuelto aparte de las gotitas dispersas de fase acuosa o fase oleosa; y
  - 0-10% de monoalcohol C<sub>1-5</sub> en peso de la fase acuosa.
- 15 2. Extracto según la reivindicación 1, donde al menos 10 % en peso de ácidos grasos  $\omega$ 3 están contenidos en lípidos polares seleccionados de fosfátidos, glicolípidos y combinaciones de los mismos.
3. Extracto según la reivindicación 1 o 2, donde el extracto contiene 0,01-10% de monoalcohol C<sub>1-5</sub> en peso de la fase acuosa.  
 20
4. Extracto según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el extracto es un extracto de una especie de microalgas de un género de microalgas o una clase de microalgas seleccionada de *Chysophyceae*, *Xantophyceae*, *Eustigmatophyceae*, *Baccilariophyceae*, *Dinophyceae*, *Rodophyceae*,  
 25 *Phaeophyceae*, *Chlorophyceae*, *Prasinophyceae*, *Cryptophyceae*, *Botrycoccus*, *Isochrysis*, *Tetraselmis*, *Neochloris*, *Scenedesmus*, *Chlorobotrys*, *Eustigmatos*, *Pseudostaurastrum*, *Vischeria*, *Monodopsis*, *Ellipsoidion*, *Pseudocharaciopsis* y combinaciones de los mismos.
5. Extracto según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde 200 gramos del extracto pueden ser completamente disueltos en 1 litro de monoalcohol C<sub>1-5</sub>.  
 30
6. Extracto según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el extracto contiene al menos 1% en peso de material de pared celular de algas celulósicas hidrolizadas de sustancia seca.
7. Proceso de extracción de una fase oleosa de microalgas que contienen paredes celulares, dicha fase de aceite que contiene al menos 1% en peso de ácidos grasos totales de ácidos grasos  $\omega$ 3 seleccionados de EPA, DHA y combinaciones de los mismos, el proceso que comprende:  
 35 - combinar biomasa de microalgas húmedas con los ácidos grasos  $\omega$ 3 con una preparación enzimática teniendo actividad celulasa,  $\beta$ -glucanasa o  $\beta$ -glucosidasa;
- permitir que la preparación enzimática degrade las paredes celulares de las microalgas;
  - 40 - aislar de la biomasa tratada con enzimas al menos 20% en peso de un líquido de la biomasa de microalgas húmeda, dicho líquido siendo un extracto bifásico comprendiendo 50-95 % en peso de una fase acuosa y 5-50 % en peso de una fase oleosa; y
  - separar la fase oleosa de la fase acuosa.
- 45 8. Proceso según la reivindicación 7, donde la preparación enzimática se combina con la biomasa en una cantidad suficiente para proporcionar al menos 1 UI por gramo de sustancia seca de actividad de endoglucanasa y/o al menos 0,2 UI por gramo de sustancia seca de unidades de  $\beta$ -glucanasa y/o al menos 0,8 UI por gramo de sustancia seca de actividad  $\beta$ -glucosidasa.
- 50 9. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, donde la fase oleosa es separada de la fase acuosa por centrifugación o decantación.
10. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 7-9, donde el extracto bifásico producido en el proceso es un extracto bifásico según cualquiera de las reivindicaciones 1-6.  
 55
11. Uso de un extracto bifásico según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en la producción de productos alimenticios, preparaciones nutricionales de bebidas, productos farmacéuticos, pienso para animales o productos cosméticos.  
 60