

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 210**

51 Int. Cl.:

<b>A23D 9/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/00</b>	(2006.01)
<b>C11C 3/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 8/04</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/20</b>	(2006.01)
<b>A61K 8/36</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.06.2014 PCT/IB2014/062488**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.12.2014 WO14203219**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2014 E 14738905 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017 EP 3019020**

54 Título: **Composición lipídica a base de triacilglicerol**

30 Prioridad:

**21.06.2013 FR 1355963**

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

**12.02.2018**

73 Titular/es:

**AVRIL (50.0%)  
11-13 rue de Monceau  
75008 Paris, FR y  
UNIVERSITE PARIS-SUD (50.0%)**

72 Inventor/es:

**THEVENIEAU, FRANCE;  
SAMBOU, SOPHIE;  
VIROLLE, MARIE-JOËLLE y  
DULERMO, THIERRY**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 654 210 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

Composición lipídica a base de triacilglicerol

La presente invención se refiere a composiciones lipídicas a base de triacilgliceroles (TAG) y a sus diferentes aplicaciones.

5 El lubricante es una sustancia grasa que permite reducir los rozamientos entre dos superficies. Está compuesto en su mayor parte por un aceite de base y por aditivos que le confieren propiedades particulares. Los aceites usados son generalmente de origen mineral, vegetal, animal o sintético, y pueden reciclarse.

Debido al empobrecimiento de los recursos petroleros y a la aparición de numerosos estudios que demuestran el impacto negativo sobre el medio ambiente de los compuestos procedentes de la petroquímica, los aceites de origen vegetal o animal tienden a sustituir a los aceites de origen petroquímico para aplicaciones en numerosos campos, en particular en el campo de los lubricantes.

El uso de biolubricantes ha surgido a lo largo de estos últimos años (aceite de origen vegetal o animal) y aunque es ventajoso desde un punto de vista ecológico, sigue siendo marginal (menos del 5% del mercado de los lubricantes) debido a los costes de producción muy altos con respecto a los lubricantes de origen petroquímico y a las dificultades de aprovisionamiento de aceites vegetales que necesitan cultivos de grandes envergaduras (cultivos oleaginosos) con frecuencia destinados a la alimentación humana o animal.

Sin embargo, el uso de estos biolubricantes resulta muy ventajoso, concretamente en las aplicaciones en las que la recuperación de los lubricantes es casi imposible o es propensa a pérdidas accidentales (en el suelo o en las aguas), ya que su impacto sobre el medio ambiente es limitado y permiten minimizar los riesgos sanitarios.

20 Por ello, en una lógica de desarrollo de productos más respetuosos con el medio ambiente, se usan aceites vegetales y animales en diversas aplicaciones.

El documento "Acides gras: nomenclature et sources alimentaires", de Cuvier C Cabaraux J.-F., Dufrasne I., Hornick J.-L., Istasse L. Manuscrit Ann. Méd. Vét., 2004, 148, 133-140, describe el contenido en ácidos grasos de las composiciones lipídicas de diferentes productos de origen animal o vegetal: aceite de colza, de maíz, de girasol, de oliva, de lino, etc.

Se describen composiciones lipídicas a base de triacilgliceroles en la solicitud de patente de NESTE OIL OYJ EP 2390341, procedentes de un procedimiento de síntesis de lípidos por un microorganismo. El estudio trata de la acumulación en el citoplasma de TAG por el microorganismo.

Existe una necesidad de una fuente lipídica alternativa biodegradable, no tóxica y/o de fuente biológica.

30 Para ello, la invención se refiere a una composición lipídica que comprende ácidos grasos principalmente en forma de triacilgliceroles, en la que:

- al menos el 50% de los ácidos grasos son ácido 14-metil-pentadecanoico, concretamente al menos el 55% de los ácidos grasos son ácido 14-metil-pentadecanoico, y

- al menos el 8% de los ácidos grasos son ácido 12-metil-tetradecanoico,

35 expresándose los porcentajes en peso de los ácidos grasos totales de la composición.

Por "composición lipídica" se entiende una composición que comprende al menos el 50% de lípidos, porcentaje expresado en peso total de la composición. La composición comprende ventajosamente al menos el 51%, el 52%, el 53%, el 54%, el 55%, el 56%, el 57%, el 58%, el 59%, el 60%, el 61%, el 62%, el 63%, el 64%, el 65%, el 66%, el 67%, el 68%, el 69%, el 70%, el 71%, el 72%, el 73%, el 74%, el 75%, el 76%, el 77%, el 78%, el 79%, el 80%, el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% de lípidos, porcentajes expresados en peso total de la composición. La composición puede comprender cualquier otro componente respetando las proporciones de lípido mencionadas anteriormente.

Esta composición lipídica comprende ácidos grasos que están principalmente en forma de TAG.

45 Por "ácidos grasos principalmente en forma de triacilgliceroles" se entiende que al menos la mitad (al menos el 50% en peso total de los ácidos grasos totales de la composición) de los ácidos grasos presentes en la composición están esterificados con una molécula de triacilglicerol. La composición comprende ventajosamente al menos el 51%, el 52%, el 53%, el 54%, el 55%, el 56%, el 57%, el 58%, el 59%, el 60%, el 61%, el 62%, el 63%, el 64%, el 65%, el 66%, el 67%, el 68%, el 69%, el 70%, el 71%, el 72%, el 73%, el 74%, el 75%, el 76%, el 77%, el 78%, el 79%, el 80%, el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% de los ácidos grasos en forma de triacilgliceroles, estos porcentajes se expresan en peso total de los ácidos grasos de la composición.

Por tanto, la composición según la invención constituye una fuente interesante y alternativa de TAG, fácilmente extraíbles y presentes en gran cantidad. Los TAG, que son los principales componentes de los aceites, son compuestos químicos con gran potencial industrial. En particular se conocen por tener un poder lubricante natural y una buena adhesividad a las superficies metálicas.

- 5 Además, tal como se precisará a continuación, la composición según la invención comprende ácidos grasos de cadena alifática corta que pueden comprender motivos particulares, tales como, por ejemplo, la presencia de un grupo metilo en el penúltimo o antepenúltimo átomo de carbono de la cadena, o incluso un grupo hidroxilo.

Ventajosamente, la composición según la invención comprende una mayoría de ácidos grasos saturados. También comprende ácidos grasos insaturados en menor cantidad, presentando dichos ácidos grasos insaturados un número de insaturaciones reducido (preferiblemente menos de 3). Estas diferentes características confieren a la composición propiedades mejoradas: un mejor comportamiento del aceite a baja temperatura, una resistencia a la termooxidación y/o una mejor fluidez.

10

Por otro lado, puede obtenerse una composición según la invención mediante síntesis química y/o mediante síntesis biológica mediante un procedimiento que pone en práctica un microorganismo.

- 15 Al estar los ácidos grasos de la composición según la invención disponibles en el comercio, el experto en la técnica puede realizar fácilmente una reacción de esterificación en presencia de glicerol con el fin de obtener una mezcla de monoacilgliceroles, diacilgliceroles y triacilgliceroles. La naturaleza de los ácidos grasos y las proporciones según la invención estarán predeterminadas, y puede predeterminarlas fácilmente el experto en la técnica.

La composición también puede sintetizarse por un microorganismo, en medio nutricional que comprende una fuente de carbono, concretamente glicerol, glucosa o cualquier otra fuente de carbono menos refinada procedente por ejemplo de los residuos de la industria agrícola tales como residuos industriales orgánicos o restos, residuos orgánicos agrícolas, residuos urbanos o residuos microbianos, o mezclas de los mismos.

20

El aumento de la acumulación de TAG en el citoplasma del microorganismo puede favorecerse mediante el uso del glicerol como fuente principal de carbono, mediante una etapa de hipercompensación en fosfato o nitrógeno, o mediante una mezcla (glicerol e hipercompensación).

25

El cultivo en un medio rico y después en un medio empobrecido en nutrientes se conoce en el estado de la técnica como "hipercompensación".

En el contexto de la hipercompensación en fosfato orgánico o mineral, se añade ventajosamente al medio de precultivo de 2,5 mM a 50 mM de fosfato inorgánico, preferiblemente de 3 mM a 40 mM, más particularmente de 4 mM a 30 mM, aún más particularmente de 5 mM a 20 mM, concretamente de 5 mM a 10 mM de fosfato inorgánico.

30

Ventajosamente, puede usarse el glicerol que está fácilmente accesible a partir del sector oleaginoso como fuente de carbono en bruto o refinado.

El ácido 14-metil-pentadecanoico también se denomina mediante su nombre vulgar "ácido graso iso-hexadecanoico" o mediante su nomenclatura fisiológica "iso-C16:0".

- 35 El ácido 12-metil-tetradecanoico, con su nombre vulgar "ácido graso anteiso-heptadecanoico", también se denomina mediante su nomenclatura fisiológica "anteiso-C15:0".

Preferiblemente, la composición comprende al menos el 55% de triacilgliceroles, el porcentaje se expresa en peso total de la composición. De manera más ventajosa, la composición comprende al menos el 56%, el 57%, el 58%, el 59%, el 60%, el 61%, el 62%, el 63%, el 64%, el 65%, el 66%, el 67%, el 68%, el 69%, el 70%, el 71%, el 72%, el 73%, el 74%, el 75%, el 76%, el 77%, el 78%, el 79%, el 80%, el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% de triacilgliceroles, expresándose los porcentajes en peso total de la composición lipídica.

40

Ventajosamente, la composición comprende principalmente compuestos procedentes de la biomasa (biosintetizados), de manera más ventajosa, todos los compuestos de la composición son procedentes de la biomasa.

45

De manera ventajosa, la composición lipídica de la invención comprende al menos el 55% de ácido 14-metil-pentadecanoico, en peso de los ácidos grasos totales de la composición. Preferiblemente, la composición comprende al menos el 56%, el 57%, el 58%, el 59%, el 60%, el 61%, el 62%, el 63%, el 64%, el 65%, el 66%, el 67%, el 68%, el 69%, el 70%, el 71%, el 72%, el 73%, el 74%, el 75%, el 76%, el 77%, el 78%, el 79%, el 80%, el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% y el 99% de ácido 14-metil-pentadecanoico, porcentaje expresado en peso de los ácidos grasos totales de la composición.

50

Según un modo de realización ventajoso, la composición según la invención definida anteriormente comprende además del 6,5% al 20% de ácido graso 12-metil-tridecanoico, expresándose los porcentajes en peso de los ácidos

grasos totales de la composición.

El ácido 12-metil-tridecanoico también se denomina mediante su nombre vulgar "ácido graso iso-tetradecanoico" o mediante su nomenclatura fisiológica "iso-C14:0".

- 5 Preferiblemente, la composición según la invención comprende el 7%, el 8%, el 9%, el 10%, el 11%, el 12%, el 13%, el 14%, el 15%, el 16%, el 17%, el 18%, el 19% o el 20% de ácido graso 12-metil-tridecanoico, expresándose los porcentajes en peso total de la composición.

De manera también ventajosa, la composición según la invención comprende al menos el 50% de ácido 14-metil-pentadecanoico, al menos el 8% de ácido 12-metil-tetradecanoico y del 6,5% al 20% de ácido graso 12-metil-tridecanoico, expresándose los porcentajes en peso de los ácidos grasos totales de la composición.

- 10 Según un modo de realización ventajoso, la composición según la invención definida anteriormente comprende además del 6,5% al 20% de ácido graso 14-metil-hexadecanoico, expresándose los porcentajes en peso de los ácidos grasos totales de la composición.

El ácido 14-metil-hexadecanoico también se denomina mediante su nombre vulgar "ácido graso anteiso-heptadecanoico" o mediante su nomenclatura fisiológica "anteiso-C17:0".

- 15 Preferiblemente, la composición según la invención comprende el 7%, el 8%, el 9%, el 10%, el 11%, el 12%, el 13%, el 14%, el 15%, el 16%, el 17%, el 18%, el 19% o el 20% de ácido graso 14-metil-hexadecanoico, expresándose los porcentajes en peso total de la composición.

- 20 De manera también ventajosa, la composición comprende al menos el 50% de ácido 14-metil-pentadecanoico, al menos el 8% de ácido 12-metil-tetradecanoico, del 6,5% al 20% de ácido graso 12-metil-tridecanoico y/o del 6,5% al 20% de ácido graso 14-metil-hexadecanoico, expresándose los porcentajes en peso de los ácidos grasos totales de la composición.

Según un modo de realización ventajoso, la composición según la invención definida anteriormente comprende al menos el 8% de ácido graso 12-metil-tetradecanoico, expresándose el porcentaje en peso de los ácidos grasos totales de la composición.

- 25 Según un modo de realización ventajoso, la composición según la invención definida anteriormente comprende ácidos grasos que tienen una cadena carbonada de 8 a 22 átomos de carbono.

Preferiblemente, la cadena carbonada tiene 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 átomos de carbono, de manera más preferida de 14 a 17 átomos de carbono.

- 30 Los ácidos grasos, lineales o ramificados, pueden estar hidroxilados y/o metilados, es decir, las cadenas carbonadas están sustituidas con al menos un grupo hidroxilo y/o metilo.

La posición del grupo metilo varía ventajosamente entre el penúltimo átomo de carbono partiendo del grupo metilo terminal (iso) y el antepenúltimo (anteiso).

- 35 Ventajosamente, la composición según la invención comprende principalmente ácidos grasos saturados. Preferiblemente, la composición comprende al menos el 60% de ácidos grasos saturados, porcentaje expresado en peso total de los ácidos grasos de la composición.

Ventajosamente, al menos el 50% de los ácidos grasos insaturados presentes en la composición según la invención están monoinsaturados, porcentaje expresado en peso total de los ácidos grasos insaturados. Preferiblemente, al menos el 70% de los ácidos grasos insaturados están monoinsaturados, de manera más preferida el 90% de los ácidos grasos insaturados están monoinsaturados.

- 40 Según un modo de realización aún más ventajoso, la composición según la invención comprende al menos los ácidos grasos elegidos del ácido 12-metil-tridecanoico (iso-C14:0 / ácido iso-tetradecanoico), el ácido tetradecenoico (C14:1), el ácido 12-metil-tetradecanoico (anteiso-C15:0 / ácido anteiso-pentadecanoico), el ácido pentadecanoico (C15:0), el ácido 14-metil-pentadecanoico (iso-C16:0 / ácido iso-hexadecanoico), el ácido 14-metil-pentadecenoico (iso-C16:1 / ácido iso-hexadecenoico), el ácido hexadecanoico (C16:0), el ácido hexadecenoico (C16:1), el ácido 15-metil-hexadecanoico (iso-C17:0 / ácido iso-heptadecanoico), el ácido heptadecanoico (C17:0), el ácido heptadecenoico C17:1 y/o el ácido 14-metil-hexadecanoico (anteiso-C17:0 / ácido anteiso-heptadecanoico).

Preferiblemente, todos los ácidos grasos de la composición se eligen de los mencionados anteriormente.

Según un modo de realización aún más ventajoso, los ácidos grasos totales de la composición están presentes en las proporciones tal como se definen a continuación:

- 50 - del 6,7% al 7,7% de iso-C14:0,

- del 3,1% al 4% C14:1,
- del 9,8 al 11% de anteiso-C15:0,
- del 0,1% al 0,7% de C15:0,
- del 61,5% al 62,5% de iso-C16:0,

- 5
- del 0,5% al 1,5% de iso-C16:1,
  - del 3,1% al 4% de C16:0,
  - del 0,1% al 7,7% de C16:1,
  - del 0,5% al 1,5% de C17:0,
  - del 0,5% al 1,5% de C17:1,

- 10
- del 1,1% al 2,1% de iso-C17:0, y
  - del 6,7% al 7,7% de anteiso-C17:0,

expresándose los porcentajes en peso de los ácidos grasos totales de la composición.

- 15
- La composición según la invención puede comprender, además, cualquier otro tipo de lípidos y/o impurezas, siendo los lípidos por ejemplo ácidos grasos libres, oligómeros, esteroides, ésteres de ácido graso, ésteres de esteroles, monoacilglicéridos y/o diacilglicéridos.

- 20
- La composición puede comprender hasta el 49% de impurezas, porcentaje expresado en peso total de la composición. Las impurezas pueden ser residuos celulares tales como las proteínas, los lípidos de membrana tales como los esfingolípidos, fosfolípidos u otros, o ácidos nucleicos, etc. Preferiblemente, la composición comprende el 1%, el 2%, el 3%, el 4%, el 5%, el 6%, el 7%, el 8%, el 9%, el 10%, el 11%, el 12%, el 13%, el 14%, el 15%, el 16%, el 17%, el 18%, el 19%, el 20%, el 21%, el 22%, el 23%, el 24%, el 25%, el 26%, el 27%, el 28%, el 29%, el 30%, el 31%, el 32%, el 33%, el 34%, el 35%, el 36%, el 37%, el 38%, el 39%, el 40%, el 41%, el 42%, el 43%, el 44%, el 45%, el 46%, el 47% o el 48% de impureza, porcentaje expresado en peso total de la composición.

Ventajosamente, la proporción de residuos tiene la siguiente composición:

- 25
- del 35% al 45% de proteínas,
  - del 2% al 10% de ADN,
  - del 10% al 20% de ARN,
  - del 10% al 15% de peptidoglicanos,
  - de 2 al 5% de hidrocarburos,
  - del 5% al 10% de ácido teicoico,
- 30
- del 0,1% al 5% de moléculas solubles, y
  - del 5% al 10% de cenizas,

expresándose los porcentajes en peso total de la composición de residuos celulares.

Puede comprender además moléculas solubles tales como los antibióticos, los sideróforos y las vitaminas.

- 35
- Según aún otro aspecto ventajoso, la invención también se refiere a un extracto de microorganismo que comprende una composición lipídica tal como se describió anteriormente.

- 40
- De manera ventajosa, la composición lipídica representa al menos el 10% en peso del extracto total, preferiblemente al menos el 40%. De manera aún más ventajosa, la composición lipídica representa el 41%, el 42%, el 43%, el 44%, el 45%, el 46%, el 47%, el 48%, el 49%, el 50%, el 51%, el 52%, el 53%, el 54%, el 55%, el 56%, el 57%, el 58%, el 59%, el 60%, el 61%, el 62%, el 63%, el 64%, el 65%, el 66%, el 67%, el 68%, el 69%, el 70%, el 71%, el 72%, el 73%, el 74%, el 75%, el 76%, el 77%, el 78%, el 79%, el 80%, el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% en peso del extracto total.

El extracto de microorganismo mencionado anteriormente comprende además residuos celulares específicos del microorganismo en cuestión. En la tabla 1 a continuación se facilitan a modo de ejemplo los constituyentes

mayoritarios (átomos principales) de la biomasa celular de varias bacterias:

Microorganismos	Composición de la biomasa
<i>Escherichia coli</i>	C H 1,77 O 0,49 N 0,24
<i>Klebsiella aerogenes</i>	C H 1,75 O 0,43 N 0,22
<i>Paraccocus denitrificans</i>	C H 1,81 O 0,51 N 0,20
<i>Pseudomonas C12B</i>	C H 2,00 O 0,52 N 0,23
<i>Aerobacter aerogenes</i>	C H 1,83 O 0,55 N 0,25
<i>Streptomyces cattleya</i>	C H 1,60 O 0,58 N 0,17
<i>Streptomyces clavuligerus</i>	C H 1,82 O 0,62 N 0,21
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	C H 1,77 O 0,49 N 0,22
<i>Brevibacterium ssp</i>	C H 1,62 O 0,50 N 0,12
Media	C H 1,80 O 0,50 N 0,20

Tabla 1: Constituyentes mayoritarios de la biomasa celular

Estos resultados se obtuvieron mediante análisis con un aparato Thermo Fisher Flash 2000 serie CHNS/O, comercializado por Thermo Scientific.

- 5 Preferiblemente, el extracto de microorganismo según la invención comprende los constituyentes celulares clásicos: proteínas, ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN), fosfolípidos, triacilglicerolos, moléculas solubles, peptidoglicanos, ácido teicoico, hidratos de carbono y cenizas celulares.

10 Según un aspecto de la invención, la presente invención también se refiere al uso de una composición lipídica tal como se describió anteriormente o de un extracto tal como se describió anteriormente, para la preparación de biocombustible, de lubricante, de tensioactivos, de revestimientos (pinturas, tintas,..), de disolventes, de ingredientes alimentarios o como compuestos intermedios de síntesis para oleoquímica.

15 Es posible obtener biodiésel mediante procedimientos conocidos, por ejemplo un procedimiento de transesterificación de los triglicéridos presentes en la composición según la invención o el extracto de microorganismo según la invención, para la producción de ésteres metílicos de aceites que sirven de combustibles con la denominación de biodiésel.

La transesterificación es una reacción que comprende tres etapas reversibles en serie en las que los triglicéridos se convierten en diglicéridos, después éstos se convierten en monoglicéridos y finalmente los monoglicéridos se convierten en ésteres (biodiésel) y glicerol (coproducto).

20 A lo largo de la reacción de transesterificación, los aceites o grasas reaccionan con un alcohol de cadena corta (generalmente el metanol) en presencia de un catalizador.

Esta reacción puede realizarse mediante catálisis homogénea, con catalizadores solubles en el medio de reacción, o mediante catálisis heterogénea, con catalizadores totalmente insolubles en el reactivo.

25 En la actualidad, la catálisis homogénea es la técnica usada más generalmente en los procedimientos de producción de biodiésel. La transesterificación puede realizarse mediante catálisis básica o ácida. Generalmente se obtiene una mayor reactividad en medio básico.

Existen tres grandes clases de catalizadores: los catalizadores básicos, los catalizadores ácidos y los demás catalizadores.

30 A modo de ejemplo, pueden mencionarse los hidróxidos, alcoholatos o jabones de metales alcalinos o alcalinotérreos (Li, Na, K, Ca, Ba, Cs...), las aminas de la familia de las guanidinas; los ácidos minerales (HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), los ácidos sulfónicos, las resinas intercambiadoras de iones (ácido fuerte), las zeolitas, los alcoholatos de titanio (Ti(OBu)<sub>4</sub>, Ti(OiPr)<sub>4</sub>), los óxidos de diversos metales (Sn, Mg, Zn, Ti, Pb).

El biodiésel obtenido puede usarse en mezcla con diésel de origen fósil o puro como combustible.

El lubricante obtenido a partir de la composición según la invención puede comprender además aditivos usados generalmente en una composición de lubricante.

35 La invención también se refiere a una composición farmacéutica o cosmética que comprende una composición lipídica tal como se describió anteriormente, o un extracto tal como se definió anteriormente, en asociación con un vehículo farmacéutica o cosméticamente aceptable.

40 Los ácidos carboxílicos, o ácidos grasos, mencionados anteriormente de la composición pueden proteger ventajosamente del calor a las fibras que contienen queratina, y en particular los ácidos grasos de forma anteiso. Por tanto, la composición está adaptada para su uso en el peinado temporal en caliente del cabello, concretamente del cabello humano.

La invención se refiere ventajosamente a una composición cosmética que comprende una composición tal como se definió anteriormente, en asociación con un componente activo reafirmante, estando dicha composición cosmética concretamente en forma de espuma.

5 Una composición cosmética de este tipo puede usarse para el peinado de las fibras queratínicas. Además, la invención se refiere ventajosamente al uso de la composición cosmética mencionada anteriormente para el peinado de las fibras queratínicas.

10 La composición según la invención puede transformarse en amonio cuaternario y por tanto usarse (a nivel del 10%) en productos cosméticos que comprenden al menos un componente activo reafirmante y que se presentan en particular en forma de espuma. Por tanto, es posible obtener un resultado de peinado muy duradero, concretamente con una humedad del aire importante.

15 Las sales de amonio cuaternario o aminos cuaternarios se producen mediante una reacción de cuaternización. Se trata generalmente de una reacción entre una alquil-amina (o alquil-amidoamina) y un halogenuro de alquilo o sal de alquilo. Por ejemplo, la reacción se realiza en dos etapas, una primera etapa a lo largo de la cual los ácidos grasos de la composición se hacen reaccionar con un exceso de dimetilaminopropilamina para formar una alquilamidoamina, y una segunda etapa durante la cual la alquilamidoamina de la primera etapa reacciona a su vez con sulfato de dietilo en presencia de butilenglicol para formar el amonio cuaternario final que se usará en la formulación cosmética de interés.

Un componente activo reafirmante lo conoce el experto en la técnica y puede ser concretamente una cera vegetal o animal, por ejemplo la cera de abeja.

20 La composición comprende ventajosamente derivados de éster elegidos del grupo constituido por los ésteres de esteroides, los ésteres de azúcares, los ésteres de 2-etilhexanol, los ésteres de alcoholes superiores, solos o en mezcla entre sí.

Estos derivados pueden formar parte de la formulación de productos cosméticos o de medicamentos de uso externo, concretamente para aplicaciones tópicas cutáneas.

25 La asociación de la composición según la invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable permite por ejemplo optimizar la hidratación de la piel, el alisado del cabello o un efecto elástico sobre los tejidos. Por otro lado puede tener otros efectos, tales como por ejemplo la asimilación facilitada de un medicamento.

30 Por ejemplo, es posible encapsular principios activos en vesículas lipídicas que tienen una composición tal que se fusionan fácilmente con los lípidos de membrana lo que facilita en gran medida la entrada del principio activo en las células. Ventajosamente, la composición lipídica o el extracto de microorganismos pueden usarse como medicamento o alicamento (complemento alimentario).

Puede tener una aplicación concretamente en el tratamiento de problemas de la piel o también como cicatrizante.

La invención se comprenderá mejor tras la lectura de las figuras y de los ejemplos que se facilitan únicamente a título ilustrativo y que no presentan ningún carácter limitativo.

35 La figura 1 representa el perfil lipídico de composiciones lipídicas obtenidas mediante cultivo de la cepa *Streptomyces lividans* TK24 en medio que comprende glucosa como fuente principal de carbono (55 mM) durante 72 horas o 96 horas. Los diferentes ácidos grasos se facilitan en las abscisas y la cantidad en  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de biomasa seca se expresa en las ordenadas.

40 La figura 2 representa el perfil lipídico de composiciones lipídicas obtenidas mediante cultivo de la cepa *Streptomyces coelicolor* M1146 en medio que comprende glucosa como fuente principal de carbono (55 mM) durante 72 horas o 96 horas. Los diferentes ácidos grasos se facilitan en las abscisas y la cantidad en  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de biomasa seca se expresa en las ordenadas.

45 La figura 3 representa el perfil lipídico de composiciones lipídicas obtenidas mediante cultivo de la cepa *Streptomyces lividans* TK24 en presencia de glicerol purificado como fuente principal de carbono, durante 96 horas, a diferentes concentraciones. Los diferentes ácidos grasos presentes se facilitan en las abscisas y la cantidad en  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de biomasa seca se expresa en las ordenadas.

La figura 4 representa el perfil lipídico de composiciones lipídicas obtenidas mediante cultivo de la cepa *Streptomyces lividans* TK24 en presencia de glicerol no refinado, es decir en bruto, como fuente principal de carbono, durante 96 horas, a diferentes concentraciones.

50 La figura 5 representa una cromatografía en capa fina de composiciones lipídicas según la invención. Estas composiciones se obtienen mediante dos cultivos de tres cepas diferentes de *Streptomyces* (1: *Streptomyces lividans* TK24 silvestre; 2: *Streptomyces lividans* TK24 mutante para el gen *ppk*; 3: *Streptomyces coelicolor* M145).

Los diferentes ácidos grasos presentes se facilitan en las abscisas y la cantidad en  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de biomasa seca se

expresa en las ordenadas.

Ejemplo 1: Síntesis de una composición lipídica según la invención, mediante un procedimiento de cultivo de una cepa de *Streptomyces*.

5 Determinadas especies de *Streptomyces*, como numerosos otros microorganismos, tienen la capacidad natural de acumular en su citoplasma más del 40% de su peso seco en TAG.

Los *Streptomyces*, como numerosos otros microorganismos, tienen la capacidad de acumular en su citoplasma de media el 20% de su peso en TAG.

Los TAG están constituidos por una molécula de glicerol y por tres ácidos grasos (de naturaleza idéntica o diferente) esterificados en los grupos hidroxilo del glicerol.

10 En este ejemplo, la producción de la composición lipídica según la invención se realizó a partir de un cultivo de *Streptomyces*, pero habría podido realizarse igualmente a partir de otras cepas bacterianas de diferentes géneros del orden de los actinomicetos tales como *Rhodococcus*, *Micrococcus* o *Actinomyces*.

A. Diferentes procedimientos de cultivo

15 Se ponen en cultivo varias cepas de *Streptomyces* según diferentes procedimientos detallados a continuación: cultivo con glucosa como fuente principal de carbono (a), cultivo con glicerol como fuente principal de carbono (b), y cultivo con glicerol combinado con una hipercompensación en fosfato (c).

Se entiende por "fuente principal de carbono" una cantidad de compuesto carbonado metabolizable por las bacterias y que permite producir energía. La fuente principal de carbono representa más del 90% del aporte de carbono en el medio de cultivo o de precultivo.

20 (a) Cultivo de *Streptomyces lividans* TK24 y *Streptomyces coelicolor* M1146 en medio enriquecido con glucosa

Se recubrieron esporas ( $10^6$ ) de dos cepas de *Streptomyces lividans* TK24 y *Streptomyces coelicolor* M1146 sobre un medio de agar R2YE (glucosa 55 mM, Pi 1 mM) sobre cuya superficie se depositó un material de celofán poroso frente a los elementos nutritivos del medio. Se hicieron crecer estas cepas durante 72 h a 28°C.

El medio R2YE tiene la siguiente composición:

- 25 -  $K_2SO_4$  ( $1,4 \cdot 10^{-3}$  mol/l y 0,25 g/l) MM=174 g/mol  
 -  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  ( $5 \cdot 10^{-2}$  mol/l y 10,12 g/l) MM=203 g/mol  
 - Glucosa o glicerol  
 - Aminoácidos de caseína (0,1 g/l)

Complementación tras el tratamiento en autoclave en sólido

- 30 -  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  ( $2 \cdot 10^{-2}$  mol/l y 2,94 g/l) MM=147 g/mol  
 - L-prolina ( $2,6 \cdot 10^{-2}$  mol/l y 3 g/l) MM=115 g/mol  
 - Tampón TES ( $2,5 \cdot 10^{-2}$  mol/l y 5,73 g/l) MM=2304 g/mol  
 - Oligoelementos (2 ml/l)  
 - Extracto de levadura (5 g/l)

35 - NaOH ( $5 \cdot 10^{-3}$  mol/l y 0,2 g/l) MM=30 g/mol

La composición obtenida se analiza después de una etapa de extracción y según los métodos de análisis descritos en el punto B. Los resultados se presentan en la figura 1 para el cultivo de *Streptomyces lividans* TK24 y en la figura 2 para el cultivo de *Streptomyces coelicolor* M1146.

40 En la figura 1 se observa una composición que presenta una cantidad importante de ácido graso iso-C16:0 y anteiso-C15:0. Estas proporciones son las de la invención, es decir, al menos el 50% de iso-C16:0 y al menos el 8% de anteiso-C15:0.

De manera idéntica, en la figura 2 se observa una composición que presenta una cantidad importante de ácido graso iso-C16:0 y anteiso-C15:0, siendo también las proporciones las de la invención, es decir, al menos el 50% de iso-C16:0 y al menos el 8% de anteiso-C15:0.

45 (b) Cultivo de *Streptomyces lividans* TK24 en medio enriquecido con glicerol



Se recubrieron esporas ( $10^6$ ) de dos cepas de *Streptomyces lividans* TK24 sobre un medio de agar R2YE que contenía glicerol purificado o en bruto (glicerina, Prolea) a diferentes concentraciones, sobre cuya superficie se depositó un material de celofán poroso frente a los elementos nutritivos del medio. Se hicieron crecer estas cepas durante 96 h a 28°C.

- 5 La composición obtenida se analiza después de una etapa de extracción y según los métodos de análisis descritos en el punto B. Los resultados se presentan en la figura 3 para el cultivo sobre glicerol purificado y en la figura 4 para el cultivo en glicerol no refinado.

10 El glicerol en bruto puede refinarse mediante tratamiento con carbón activo para eliminar las impurezas orgánicas, mediante tratamiento alcalino para eliminar los ésteres del glicerol que no han reaccionado, y mediante intercambio de iones para eliminar las sales. El glicerol obtenido mediante una serie de destilación presenta una alta pureza (>99,5%), entonces se dice que está refinado.

En la figura 3 se observa que, en presencia de una cantidad de glicerol refinado superior a 0,2 M, la composición comprende una cantidad de ácido graso iso-C16:0 de aproximadamente 100  $\mu\text{m}/\text{mg}$  del peso seco y aproximadamente 30  $\mu\text{m}/\text{mg}$  del peso seco de ácido graso anteiso-C15:0.

- 15 De manera equivalente, en la figura 4 se observa que, en presencia de una cantidad de glicerol no refinado superior a 0,2 M, la composición comprende una cantidad de ácido graso iso-C16:0 de aproximadamente 80  $\mu\text{m}/\text{mg}$  del peso seco y aproximadamente 30  $\mu\text{m}/\text{mg}$  del peso seco de ácido graso anteiso-C15:0.

(c) Cultivo de *Streptomyces coelicolor* M145 en medio enriquecido con glicerol en combinación con una hipercompensación en fosfato (P)

- 20 Se cultivó una cepa de *Streptomyces lividans* TK24 durante 96 h en medio líquido R2YE que contenía glicerol (0,2 M) y fosfato (1 mM).

La composición obtenida de ácidos grasos, tras las etapas de extracción y de análisis descritas en el punto B, se presenta en la siguiente tabla 2:

Ácidos grasos	Cantidad (g) <sup>1</sup>
iso-C14:0	3,5
C14:1	1,75
anteiso-C15:0	5
C15:0	0,1
iso-C16:0	30
iso-C16:1	0,5
C16:0	1,75
C16:1	0,25
iso-C17:0	0,8
anteiso-C17:0	3,5
C17:0	0,5
C17:1	0,5

<sup>1</sup>: valores expresados para 100 g del peso de la biomasa seca.

- 25 Tabla 2: Composición de los ácidos grasos presentes en la composición

Se observa que la composición comprende una cantidad de ácido graso iso-C16:0 de aproximadamente 30 g del peso seco y aproximadamente 5 g del peso seco de ácido graso anteiso-C15:0. Estas proporciones son las de la invención, es decir, al menos el 50% de iso-C16:0 y al menos el 8% de anteiso-C15:0.

- 30 La composición lipídica comprende ácidos grasos de cadena corta (de C14 a C17) y en su mayoría saturados. La composición también comprende ácidos grasos metilados (iso, anteiso) en más de 40 g del peso de la biomasa seca.

Se habrían obtenido resultados similares si se hubiera procedido al cultivo de *Streptomyces* en exceso y después con limitación de nitrógeno (N) en lugar de fosfato, para la etapa de hipercompensación.

- 35 B. Etapa de extracción de la composición grasa de las células y determinación de la naturaleza en ácidos grasos de la composición (naturaleza y cantidad de cada AG):

La lisis celular puede realizarse mediante cualquier técnica conocida del estado de la técnica: mediante acción de un agente físico, químico y/o biológico. En la invención, la lisis de *Streptomyces* y la extracción de los lípidos se realizó según el método descrito en: "FOLCH, J., LEES, M. & SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem. 226, 497-509 (1957)".

## ES 2 654 210 T3

Por tanto, se caracterizan y se cuantifican los lípidos presentes en la composición.

Se usó una mezcla de cloroformo:metanol 2:1 y se usan placas de sílice de tipo "sílice G60, con un tamaño de 20/20 cm y de 0,25 mm de grosor" comercializadas por Merck (Alemania).

La separación de los lípidos se realiza mediante un sistema de dos disolventes.

- 5 El disolvente A (migración a la mitad de la placa) está compuesto por etil éter de petróleo / éter / ácido acético en proporciones tales como 20/20/0,8 (vol/vol/vol).

El disolvente B (migración completa) está compuesto por di-etil éter de petróleo / éter en proporciones tales como 49/1 (vol/vol).

- 10 Al final de la migración, se realiza el revelado con  $MnCl_2$  mediante el método de carbonización: se incuba la placa de sílice durante 1 minuto en una disolución que contiene 120 ml de metanol, 120 ml de agua, 0,8 g de  $MnCl_2$  y 8 ml de ácido sulfúrico y a continuación se calienta en una estufa a 100°C hasta la aparición de las manchas oscuras de los lípidos.

La identificación de los lípidos se determina a partir de las normas de migración lipídicas (Sigma-Aldrich).

- 15 A continuación se registró la coloración de los lípidos usando el sistema de obtención de imágenes LAS-3000 y el software Multigauge de Fujifilm.

Los resultados obtenidos se presentan en la figura X que representa una cromatografía en capa fina. Se constata que la composición comprende más del 50% de TAG.

- 20 La composición en ácidos grasos también puede analizarse mediante cromatografía en fase gaseosa (CG), después de una etapa de conversión en ésteres metílicos necesaria para el análisis conocido por el experto en la técnica, según el procedimiento de *Browse et al. (1986)*.

El análisis mediante CG de ésteres metílicos de ácido graso se realiza con un cromatógrafo 7890A (Agilent) de columna capilar con un factor de cuatro VF-23 ms, 30 m \* 0,25 mm.

El gas portador es el helio que tiene una presión de entrada de 1 ml/min.

El programa de la temperatura de la columna es tal como se define a continuación:

- 25 - comenzar a 40°C durante 1 minuto,  
- aumentar la temperatura de la columna hasta 130°C en incrementos de 40°C por minuto,  
- mantener 1 minuto a una temperatura de 130°C,  
- aumentar la temperatura de la columna hasta 160°C en incrementos de 1°C por minuto,  
- mantener 1 minuto a 160°C,  
30 - aumentar la temperatura de la columna hasta 210°C en incrementos de 40°C por minuto, y  
- mantener 4 minutos a 210°C.

Una vez terminado el paso por la columna, la identificación de los picos obtenidos se realiza con comparaciones con tiempos de retención normalizados (Sigma-Aldrich).

La cuantificación se realiza mediante detección de ionización de llama a 270°C.

- 35 La cantidad total de los ácidos grasos se calcula a partir de la razón entre la suma de las áreas de los picos de EMAG y el área del pico del éster metílico del ácido octadecanoico (Sigma-Aldrich).

Ejemplo 2: Composición de un extracto de *S. coelicolor* M145 que comprende la composición según la invención.

A continuación se analiza la composición del extracto de *S. coelicolor* M145 obtenido en el punto (c).

- 40 La composición en aminoácidos, en ácidos grasos, en ácidos nucleicos y en azúcares de *S. coelicolor* se basa en la publicada por Borodina (*Borodina et al., 2005b*).

- Átomos presentes en el extracto de *Streptomyces coelicolor*: C H 1,62 O 0,45 N 0,25

- Naturaleza de los constituyentes:

Macromoléculas	Datos de la bibliografía (% de CDW)	Peso calculado a partir de la composición teórica (% de CDW)	DER (%)
Proteínas	41,2	41,1	0,17
ADN	3,6	6,0	35,36
ARN	16,7	16,7	0,00
Fosfolípidos	2,7	3,3	14,14
Triacilgliceroles	1,8	2,0	7,44
Moléculas solubles	3,0	2,6	10,10
Peptidoglicano	11,0	11,4	2,53
Hidratos de carbono	4,4	4,4	0,00
Ácido teicoico	6,6	6,8	2,11
Cenizas	9,0	5,7	31,75
Total	100,0	100,0	0,00

Tabla 3: Composición de la biomasa de *S. coelicolor* M145 ( $\mu\text{mol}$  (gramo de células deshidratadas)<sup>-1</sup>)

Los valores de los principales polímeros que forman parte de la composición de la biomasa de *S. coelicolor*, a saber las proteínas representan el 41,2% y los ácidos nucleicos el 20,3% del peso seco.

- 5 Al contrario que la cepa de *coelicolor* M145, la cepa de *S. coelicolor* M1146 (cepa con deleciones para las principales rutas de biosíntesis de antibióticos), tiene una tasa de TAG que alcanza el 30% de glucosa y el 40% de glicerol.

Ejemplo 3: Composición según la invención usada como aceite de base en un lubricante.

La composición según la invención puede transesterificarse mediante TMP (trimetilolpropano) y usarse como aceite de base en un lubricante.

- 10 En este uso, la parte de los compuestos saturados es mayoritaria con respecto a la de los compuestos insaturados. En proporción relativa, el porcentaje de los compuestos insaturados es del orden del 1 al 12% con respecto al peso de la composición.

- 15 Una composición de este tipo presenta la ventaja de ser más estable en frío y frente a la oxidación que un derivado que contiene principalmente ácidos grasos insaturados. Por otro lado, dicha composición tiene la ventaja de ser más accesible en cuanto al coste y la disponibilidad con respecto a los derivados de ácido isoesteárico usados en la actualidad.

Se obtienen las propiedades de estabilidad en frío y de estabilidad frente a la oxidación medidas generalmente para una composición lubricante a base de aceite de base de tipo derivado del TMP tal como se indican a continuación:

Propiedades	Norma	Unidad	TMPTO (base de ácidos grasos insaturados) = referencia	TMPTI (base de ácidos ramificados saturados)
Viscosidad (40°C)	ASTM D445	mm <sup>2</sup> /s	46	68
Para punto de fluidez	ASTM D97	°C	-50	-40
RPVOT*	ASTM D2272	Minutos	180	800

- 20 \* RPVOT o prueba de oxidación de recipiente a presión en rotación, se realiza con la composición más el 1,5% de Additin RC 9321 (RheinChemie).

Por tanto, el uso de aceite que comprende la composición según la invención aporta un buen compromiso entre la estabilidad en frío y la estabilidad frente a la oxidación.

Por ejemplo, del 5 al 95% de aceite con dicha composición incorporado en un aceite de base para lubricante permite aportar estas propiedades.

25

**REIVINDICACIONES**

1. Composición lipídica que comprende ácidos grasos principalmente en forma de triacilgliceroles, en la que:
  - al menos el 50% de los ácidos grasos son ácidos 14-metil-pentadecanoico, y
  - al menos el 8% de los ácidos grasos son ácidos 12-metil-tetradecanoico,

5 expresándose los porcentajes en peso de los ácidos grasos totales de la composición.
2. Composición según la reivindicación 1, en la que al menos el 55% en peso de los ácidos grasos totales de la composición son ácidos 14-metil-pentadecanoico.
3. Composición según la reivindicación 1 ó 2, que comprende además del 6,5% al 20% de ácido graso 12-metil-tridecanoico, expresándose el porcentaje en peso de los ácidos grasos totales de la composición.
- 10 4. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además del 6,5% al 20% de ácido graso 14-metil-hexadecanoico, expresándose el porcentaje en peso de los ácidos grasos totales de la composición.
5. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que los ácidos grasos tienen una cadena carbonada de 8 a 22 átomos de carbono.
- 15 6. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende al menos los ácidos grasos elegidos del ácido 12-metil-tridecanoico (iso-C14:0 / ácido iso-tetradecanoico), el ácido tetradecenoico (C14:1), el ácido 12-metil-tetradecanoico (anteiso-C15:0 / ácido anteiso-pentadecanoico), el ácido pentadecanoico (C15:0), el ácido 14-metil-pentadecanoico (iso-C16:0 / ácido iso-hexadecanoico), el ácido 14-metil-pentadecenoico (iso-C16:1 / ácido iso-hexadecenoico), el ácido hexadecanoico (C16:0), el ácido hexadecenoico (C16:1), el ácido 15-metil-hexadecanoico (iso-C17:0 / ácido iso-heptadecanoico), el ácido heptadecanoico (C17:0), el ácido heptadecenoico C17:1 y/o el ácido 14-metil-hexadecanoico (anteiso-C17:0 / ácido anteiso-heptadecanoico).
- 20 7. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que los ácidos grasos totales de la composición están presentes en proporciones tal como se definen a continuación:
  - 25 - del 6,7% al 7,7% de iso-C14:0,
  - del 3,1% al 4% de C14:1,
  - del 9,8 al 11% de anteiso-C15:0,
  - del 0,1% al 0,7% de C15:0,
  - del 61,5% al 62,5% de iso-C16:0,
  - 30 - del 0,5% al 1,5% de iso-C16:1,
  - del 3,1% al 4% de C16:0,
  - del 0,1% al 7,7% de C16:1,
  - del 0,5% al 1,5% de C17:0
  - del 0,5% al 1,5% de C17:1
  - 35 - del 1,1% al 2,1% de iso-C17:0

y

  - del 6,7% al 7,7% de anteiso-C17:0,

expresándose los porcentajes en peso de los ácidos grasos totales de la composición.
- 40 8. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además cualquier otro tipo de lípidos y/o impurezas, siendo los lípidos ácidos grasos libres, oligómeros, esteroides, ésteres de ácido graso, ésteres de esteroles, monoacilgliceroles y/o diacilgliceroles.
9. Extracto de microorganismo que comprende una composición lipídica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
10. Uso de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o de un extracto según la

reivindicación 9, para la preparación de biocarburante, de lubricante, de tensioactivos, de revestimientos, de disolventes, de ingredientes alimentarios o como compuestos intermedios de síntesis para oleoquímica.

- 5
11. Composición farmacéutica o cosmética que comprende una composición lipídica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o de un extracto según la reivindicación 9, solo o en asociación con un vehículo farmacéutica o cosméticamente aceptable.
12. Composición cosmética según la reivindicación 11, en asociación con un componente activo reafirmante, concretamente en forma de espuma.
13. Uso de una composición cosmética según la reivindicación 12, para el peinado de las fibras queratínicas.
- 10
14. Composición lipídica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o extracto según la reivindicación 9, para su uso como medicamento.

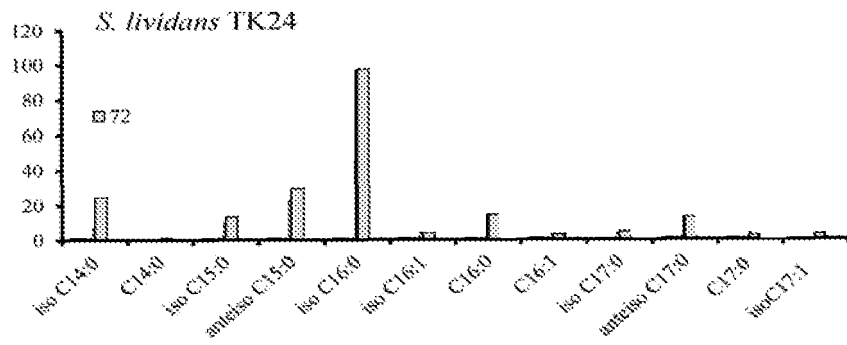


Fig. 1

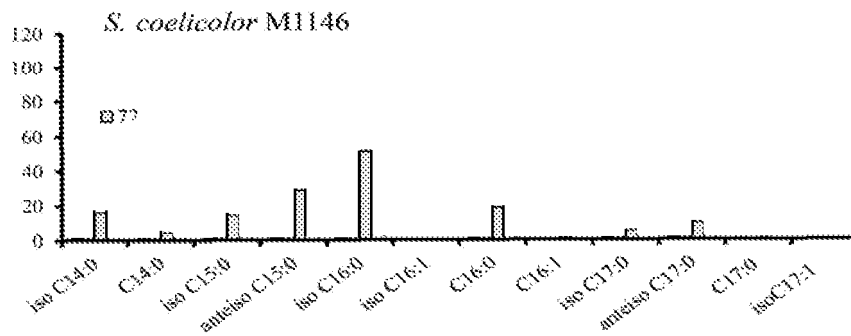


Fig. 2

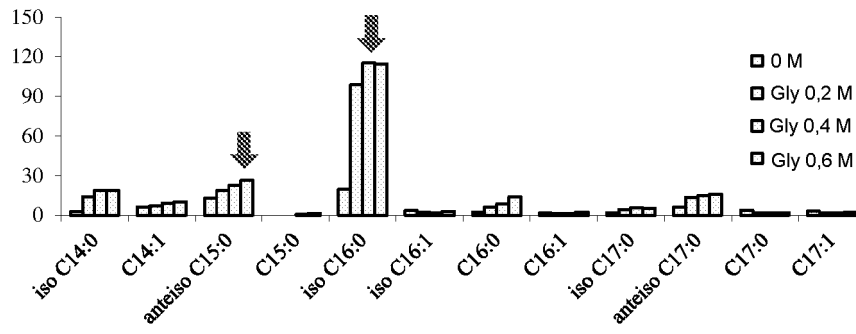


Fig. 3

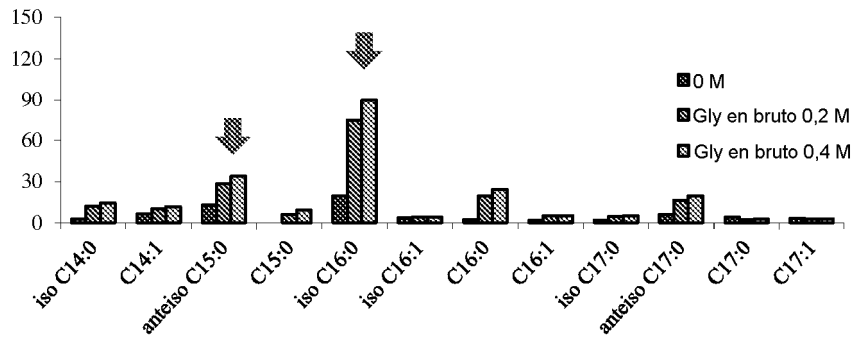


Fig. 4

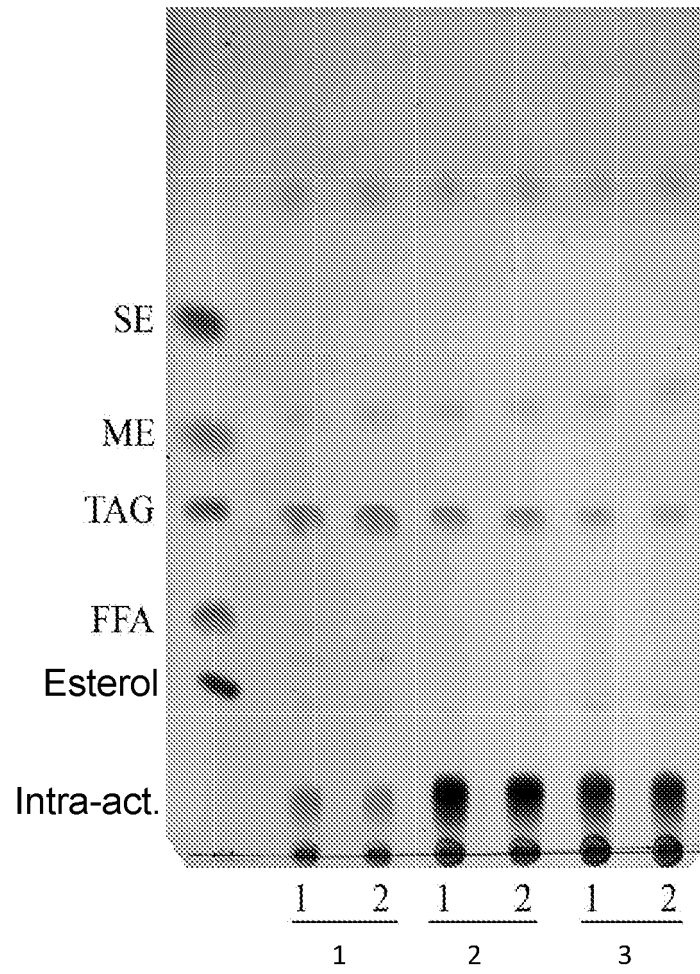


Fig. 5