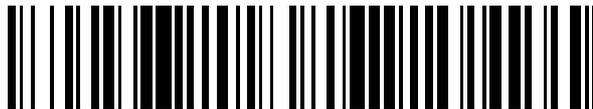


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 048**

51 Int. Cl.:

A23L 33/10	(2006.01)
A23L 17/00	(2006.01)
A23L 17/40	(2006.01)
A23D 9/013	(2006.01)
A23J 1/04	(2006.01)
A23L 5/20	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2012 PCT/IB2012/003004**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **11.07.2013 WO13102792**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2012 E 12837639 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.01.2018 EP 2800481**

54 Título: **Método para procesar crustáceos para producir productos con bajo contenido en fluoruro/bajo contenido en trimetilamina de los mismos**

30 Prioridad:

03.01.2012 US 201213342664

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

30.04.2018

73 Titular/es:

**RIMFROST TECHNOLOGIES AS (100.0%)
P.O.Box 234
6099 Fosnavåg, NO**

72 Inventor/es:

**BRUHEIM, INGE;
GRIINARI, MIKKO;
ERVIK, JON REIDAR;
REMOY, STIG RUNE;
REMOY, EVEN y
CAMERON, JOHN**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 666 048 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

Método para procesar crustáceos para producir productos con bajo contenido en fluoruro/bajo contenido en trimetilamina de los mismos

Campo de la invención

- 5 La invención se refiere a una composición de aceite de kril rica en fosfolípidos, con bajo contenido en fluoruro, trimetilamina y óxido de trimetilamina que comprende fosfolípidos, nutrientes proteicos y aceite (es decir, por ejemplo, lípidos neutros y/o triglicéridos).

Antecedentes de la invención

- 10 Los crustáceos, especialmente el kril, representan un gran recurso como material biológico. La cantidad de kril antártico (*Euphausia superba*), dependiendo del método de cálculo e investigación, es aproximadamente de 1 a 2×10^9 toneladas y el posible peso de la captura anual se estima en de 5 a 7×10^6 toneladas. Estos pequeños crustáceos, que viven en las aguas frías alrededor de la Antártida, son interesantes como fuente para proteínas, lípidos tales como fosfolípidos, ácidos grasos poliinsaturados, etc., quitina/quitosano, astaxantina y otros carotenoides, enzimas y otros materiales.

- 15 Se han desarrollado varios métodos para aislar los materiales mencionados anteriormente. Un problema es que los productos pueden contener material traza no deseado incluido en el exoesqueleto (también denominado integumento o cutícula) de los crustáceos. Por ejemplo, el kril acumula fluoruro en su exoesqueleto, aumentando de ese modo la cantidad de fluoruro de cualquier material producido o bien a través de la inclusión de partes del exoesqueleto o bien a través de procesos de extracción que no tienen en cuenta la transferencia de fluoruro al material final. En este caso el fluoruro libre o fluoruro débilmente unido puede difundir del material de exoesqueleto y al material procesado adicional, haciendo que el producto final tenga un alto contenido en iones fluoruro y/o compuestos fluorados.

- 20 El fluoruro es un compuesto que en altas concentraciones es perjudicial para la salud de animales terrestres así como toda clase de peces y crustáceos y especialmente especies de peces de agua dulce, puesto que los átomos de fluoruro tienen la tendencia a entrar en la estructura ósea de tales organismo y crear fluorosis, o debilitamiento de la estructura ósea similar en su efecto a la osteoporosis, pero diferente puesto que es la propia estructura ósea, y no la porosidad del hueso la que se ve afectada. La fluorosis esquelética es un estado caracterizado por anomalías esqueléticas y dolor articular. Está provocado por formación ósea patológica debido a la acción mitogénica del fluoruro sobre los osteoblastos. En sus formas más graves, la fluorosis esquelética provoca cifosis, incapacidad e invalidez. También pueden producirse complicaciones neurológicas secundarias en forma de mielopatía, con o sin radiculopatía. También se ha mostrado que una alta ingesta de fluoruro es tóxica para el sistema reproductor masculino en experimentos con ratas, y en seres humanos una alta ingesta de fluoruro y los síntomas de fluorosis esquelética se han asociado con una disminución de los niveles de testosterona en suero. En consecuencia, si se usa material de kril como materia prima para productos alimenticios o pienso, deben tenerse precauciones para eliminar el fluoruro a través de las etapas de procesamiento. Sin embargo, la difusión del fluoruro y la presencia de partículas minúsculas del exoesqueleto representan un problema que es difícil de superar cuando se procesa material de kril a escala industrial.

- 25 Lípidos polares tales como fosfolípidos son esenciales para las membranas celulares y también se denominan lípidos de membrana. Para la mayoría de las especies animales conocidas, el contenido de lípidos polares es casi constante. Sin embargo, esto no es así para el kril antártico. El contenido en fosfolípidos varía desde el 2% hasta el 10% dependiendo de la estación. El alto contenido, por ejemplo más del 5%, de los fosfolípidos es en principio bueno, pero significa también un problema, porque puede dar como resultado emulsiones fuertes en procesos industriales. Las emulsiones complican la separación de las fracciones lipídicas y proteicas en los procesos, tales como hidrólisis.

- 45 El aceite de kril es uno de los productos valiosos producidos a partir del kril. Contiene, entre otros, fosfolípidos, triglicéridos y el carotenoide astaxantina al tiempo que está esencialmente libre de proteína, hidratos de carbono y minerales. Las diferentes porciones del material de kril se separan entre sí mediante, entre otros: i) trituración mecánica del kril; ii) prensado del mismo, iii) hidrólisis con calor y enzimas; iv) fuerza centrífuga en dispositivos rotatorios; y v) extracción con disolvente.

- 50 Lo que se necesita en la técnica son mejoras significativas en estos enfoques bastante convencionales y se describen dentro de muchas realizaciones de la presente invención (más adelante). Por ejemplo, un material de crustáceos en bruto disgregado puede separarse y/o extraerse en diversas composiciones de aceite y/o harina de crustáceos enriquecidas con bajo contenido en fluoruro, bajo contenido en trimetilamina y/o bajo contenido en óxido de trimetilamina.

55 Sumario

La invención se refiere a una composición de aceite de kril rica en fosfolípidos, con bajo contenido en fluoruro,

trimetilamina y óxido de trimetilamina.

La presente invención es una composición de aceite de kril que comprende fosfolípidos y menos de 0,5 ppm de fluoruro y menos del 0,001% (p/p) de trimetilamina y menos del 0,02% (p/p) de óxido de trimetilamina y en donde dichos fosfolípidos son entre el 39-52% en peso. En una realización, los fosfolípidos son entre el 39-52% en peso, en la que dichos fosfolípidos comprenden al menos el 65% de fosfatidilcolina y al menos el 2,4% en peso de lisofosfatidilcolina. En una realización, el aceite de crustáceos comprende además triglicéridos, lípidos neutros, el 20 - 26% en peso de ácidos grasos omega-3 (por ejemplo, n-3), y al menos el 0,8% en peso de ácidos grasos libres.

Se describe un método para crear composiciones de crustáceos con bajo contenido en fluoruro, que comprende: a) disgregar una captura de crustáceos para dar un material que tiene un tamaño de partícula que oscila entre 1 - 25 milímetros; y b) separar dicho material de crustáceos disgregado para dar una subfracción de composición de complejo de fosfolípido-péptido (PPC), en el que dicha subfracción comprende un contenido en fluoruro de menos de 500 ppm. Se describe que el método comprende además extraer dicha subfracción de composición de PPC con un fluido que comprende un disolvente en el que se crea un aceite con bajo contenido en fluoruro, teniendo dicho aceite un contenido en fluoruro de menos de 0,5 ppm. Se describe que la extracción crea además un aceite con bajo contenido en trimetilamina/óxido de trimetilamina, en el que dicha trimetilamina es menos del 0,001% (p/p) y dicho óxido de trimetilamina es menos del 0,02% (p/p). Se describe además que la separación se realiza sin emulsiónamiento. Se describe que el disolvente comprende un disolvente apolar. Se describe además que el disolvente comprende al menos un disolvente polar. Se describe que el disolvente comprende dicho disolvente apolar y dicho al menos un disolvente polar. El disolvente apolar puede incluir, pero sin limitarse a, dióxido de carbono supercrítico y dimetil éter supercrítico. Se describe además que el disolvente polar incluye, pero sin limitarse a, etanol y acetona. Se describe que el método comprende además hidrolizar dicho material de crustáceos antes de dicha separación. Se describe que la extracción crea además una composición de PPC desaceitada. Se describe que el disolvente polar separa una composición de fosfolípidos y una composición de hidrolizado de proteína de dicha composición de PPC desaceitada. Se describe además que la extracción comprende menos de diez horas, y que la extracción comprende menos de cinco horas, o que la extracción comprende menos de dos horas. Se describe además que el material de crustáceos es material de kril. Se describe que la separación comprende una fuerza centrífuga de entre 1.000 - 1.800 g, o entre 5.000 - 10.000 g.

Definiciones

El término "material disgregado" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier material biológico que se halla sometido a una destrucción y/o rotura mecánica que da como resultado una composición que tiene tamaños de partícula de entre 1 - 25 milímetros, preferiblemente entre 3 - 15 milímetros, más preferiblemente entre 5 - 10 milímetros y lo más preferiblemente 8 milímetros.

El término "material hidrolizado" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier material biológico que se halla sometido a tratamiento enzimático y/o térmico intenso. Se esperaría que tales materiales hidrolizados tuviesen componentes de fosfolípidos/péptidos que están físicamente separados de los componentes del exoesqueleto quitinoso.

El término "crustáceo" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier organismo marino que tiene una concha externa dura (por ejemplo, un exoesqueleto quitinoso combinado con un carbonato) que engloba un interior carnoso que es un organismo vivo. Más específicamente, los crustáceos se consideran habitualmente una clase grande de artrópodos mayoritariamente acuáticos que tienen un exoesqueleto quitinoso o calcáreo y quitinoso, un par de apéndices a menudo muy modificados en cada segmento, y dos pares de antenas. Por ejemplo, un crustáceo puede incluir pero sin limitarse a, kril, langostas, camarones, cangrejos, cochinillas, pulgas de agua y/o percebes.

El término "centrífuga horizontal" se refiere a cualquier dispositivo que pueda hacer rotar una mezcla en el plano Z (en oposición al plano X y/o plano Y como con centrífugas convencionales). Esta rotación se genera mediante un elemento transportador de tipo husillo alineado horizontalmente dentro de un recinto con forma de tubo. La fuerza centrífuga inducida estratifica entonces las partículas más pesadas en los bordes externos del recinto, mientras que las partículas más ligeras forman capas más cercanas al centro del recinto. Algunas centrífugas horizontales se modifican para que comprendan una ruta de separación extendida e induzcan altas fuerzas gravitacionales (por ejemplo, un instrumento Sedicanter).

El término "disolvente polar" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier compuesto, o mezcla de compuestos, que es miscible con agua. Tales compuestos de disolvente polar incluyen, pero no se limitan a, etanol, propanol y/o acetato de etilo.

El término "disolvente apolar" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier compuesto, o mezcla de compuestos, que no es miscible con agua. Tales compuestos de disolvente apolar incluyen, pero no se limitan a, hexano, pentano, dimetil éter y/o CO₂. Puede usarse o bien dimetil éter o bien CO₂ en una fase supercrítica.

El término "supercrítico" se refiere a cualquier mezcla que comprende un producto químico (por ejemplo, dióxido de carbono (CO₂) o dimetil éter) en un estado fluido al tiempo que se mantiene a, o por encima, de su temperatura

crítica y presión crítica a las que sus características se expanden relleno un recipiente como un gas pero con una densidad como la de un líquido. Por ejemplo, el dióxido de carbono se convierte en un fluido supercrítico por encima de 31,1°C y 72,9 atm/7,39 MPa. El dióxido de carbono se comporta habitualmente como un gas en aire a temperatura y presión convencionales (STP), o como un sólido denominado hielo seco cuando se congela. Si la temperatura y presión se aumentan ambas desde STP para que estén en o por encima del punto crítico para el dióxido de carbono, puede adoptar propiedades a medio camino entre un gas y un líquido. Tal como se contempla en el presente documento, puede usarse CO₂ supercrítico como disolvente comercial e industrial durante extracciones químicas, además de su baja toxicidad e impacto medioambiental mínimo. La temperatura relativamente baja del proceso y la estabilidad del CO₂ también permiten que la mayoría de los compuestos (es decir, por ejemplo, compuestos biológicos) se extraigan con poco daño o desnaturalización. Además, debido a que la solubilidad de muchos compuestos extraídos en CO₂ puede variar con la presión, el CO₂ supercrítico es útil para realizar extracciones selectivas.

El término "fluoruro" tal como se usa en el presente documento de manera intercambiable y se refiere a cualquier compuesto que contenga un organofluoruro y/o un fluoruro inorgánico.

El término "fracción sólida con alto contenido en fluoruro" tal como se usa en el presente documento se refiere a una composición que contiene la gran mayoría del exoesqueleto de un crustáceo tras una separación por centrifugación horizontal a baja fuerza g (por ejemplo, entre 1.000 - 1.800 g) de un material de crustáceos disgregado e hidrolizado. Esta fracción contiene pequeñas partículas de exoesqueleto del crustáceo que conserva la gran mayoría del fluoruro (es decir, por ejemplo, entre el 50 - 95%) en estos organismos.

El término "bajo contenido en fluoruro" tal como se usa en el presente documento puede referirse al producto de cualquier método y/o proceso que reduce el fluoruro del material original en 10 veces (es decir, por ejemplo, desde 5 ppm hasta 0,5 ppm). Por ejemplo, "un complejo de fosfolípido-proteína de crustáceos con bajo contenido en fluoruro" comprende diez veces menos fluoruro que un "material de crustáceos disgregado e hidrolizado con bajo contenido en fluoruro".

El término "fracción de material hidrolizado con bajo contenido en fluoruro" tal como se usa en el presente documento se refiere a una composición que contiene la gran mayoría del material interno carnoso de un crustáceo tras una separación por centrifugación horizontal a baja fuerza g (por ejemplo, entre 1.000 - 1.800 g) de un material de crustáceos disgregado e hidrolizado. Esta fracción contiene pequeñas partículas de fosfolípidos, lípidos neutros, proteínas y/o péptidos que carecen en gran medida de cualquier fluoruro (es decir, por ejemplo, entre el 5% - 50% del material disgregado e hidrolizado en bruto).

El término "una subfracción de composición de complejo de fosfolípido-péptido con bajo contenido en fluoruro" tal como se usa en el presente documento se refiere a una composición con bajo contenido en fluoruro que contiene la gran mayoría del material lipídico tras una separación por centrifugación horizontal a alta fuerza g (por ejemplo, entre 5.000 - 10.000 g) de una fracción de material hidrolizado con bajo contenido en fluoruro.

El término "subfracción de composición de hidrolizado concentrada" tal como se usa en el presente documento se refiere a una composición con bajo contenido en fluoruro que contiene la gran mayoría de material magro soluble en agua tras una separación por centrifugación horizontal a alta fuerza g (por ejemplo, entre 5.000 - 10.000 g) de una fracción de material hidrolizado con bajo contenido en fluoruro.

El término "aceite con bajo contenido en fluoruro" tal como se usa en el presente documento se refiere a una composición rica en lípidos creada mediante la extracción de una subfracción de composición de complejo de fosfolípido-péptido usando un proceso de extracción selectivo, tal como con un fluido de dióxido de carbono supercrítico. Un proceso de este tipo elimina diez veces del fluoruro del material de crustáceos disgregado e hidrolizado en bruto.

El término "complejo de fosfolípido-péptido desaceitado" tal como se usa en el presente documento se refiere a una composición con bajo contenido en fluoruro que contiene la gran mayoría de la composición de materia seca creada mediante la extracción de una subfracción de composición de complejo de fosfolípido-péptido usando un proceso de extracción selectivo, tal como un fluido de dióxido de carbono supercrítico. Un PPC desaceitado comprende generalmente un contenido en triglicéridos reducido en comparación con PPC.

El término "composición de fosfolípidos" tal como se usa en el presente documento se refiere a una composición con bajo contenido en fluoruro que comprende un alto porcentaje de lípidos polares (por ejemplo, el 75%) creada mediante la extracción de un complejo de fosfolípido-péptido desaceitado usando un codisolvente, tal como etanol.

El término "hidrolizado de proteína" tal como se usa en el presente documento se refiere a una composición con bajo contenido en fluoruro que comprende un alto porcentaje de proteína (por ejemplo, el 70 - 80%) creada mediante la extracción de un complejo de fosfolípido-péptido desaceitado usando un codisolvente, tal como etanol.

El término "inmediatamente" tal como se usa en el presente documento se refiere a un periodo práctico mínimo entre que se sube a cubierta una captura de crustáceos en una red de arrastre y/o red acoplada con una transferencia directa a un disgregador adecuado. Por ejemplo, este periodo práctico mínimo no debe exceder preferiblemente 60

minutos, más preferido no debe exceder 30 minutos, incluso más preferido no debe exceder 15 minutos.

5 El término "hidrólisis" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier rotura y/o alteración realizada en la estructura proteica de un material de crustáceos disgregado, en el que las secuencias de proteína que se producen de manera natural se acortan (es decir, por ejemplo, rompiendo los enlaces peptídicos de la estructura primaria de la secuencia de aminoácidos) y/o se desnaturalizan (es decir, por ejemplo, un desplegamiento de la estructura secundaria, terciaria y/o cuaternaria de la secuencia de aminoácidos). Este proceso puede controlarse mediante enzima(s) hidrolítica(s). Por ejemplo, pueden usarse una o más enzimas proteolíticas exógenas (por ejemplo, alcalasa, neutrasa y enzimas derivadas de microorganismos o especies vegetales) en el proceso. Pueden añadirse cofactores tales como iones específicos dependiendo de las enzimas usadas. La(s) enzima(s) seleccionada(s) también puede(n) elegirse para reducir las emulsiones provocadas por un alto contenido de fosfolípidos en la materia prima. Además de la temperatura, la hidrólisis tiene lugar dentro de un tiempo suficiente y pH óptimo o casi óptimo. Por ejemplo, para la enzima exógena alcalasa, el pH óptimo es de 8, la temperatura óptima es de 60°C y el tiempo de hidrólisis es de 40-120 minutos.

15 El término "unidad de disolvente" se refiere a cualquier volumen cerrado configurado para calentar y presurizar una mezcla de fluido de dióxido de carbono supercrítico y/o un codisolvente (por ejemplo, etanol). Un volumen cerrado de este tipo puede construirse de cualquier material adecuado incluyendo pero sin limitarse a metales (por ejemplo, acero, aluminio, hierro, etc.), plástico (por ejemplo, policarbonato, polietileno, etc.), fibra de vidrio (etc.).

20 El término "tanque de extracción" se refiere a cualquier volumen cerrado configurado para soportar un calor y una presión suficientes para realizar la extracción de lípidos y proteínas de una biomasa en bruto usando un fluido de dióxido de carbono supercrítico. Tal como se diseña, el tanque de extracción contemplado en el presente documento está configurado de manera que los disolventes que contienen los lípidos y las proteínas extraídos suben hasta la parte superior del tanque para transferirse a una unidad separadora. Un volumen cerrado de este tipo puede construirse de cualquier material adecuado incluyendo pero sin limitarse a metales (por ejemplo, acero, aluminio, hierro, etc.), plásticos (por ejemplo, policarbonato, polietileno, etc.), fibra de vidrio (etc.).

25 El término "unidad separadora" se refiere a cualquier volumen cerrado configurado con una centrífuga que puede separar los componentes de los lípidos y las proteínas extraídos recibidos de un tanque de extracción. Los componentes de extracción respectivos salen de la unidad separadora por medio de orificios de salida de manera que los disolventes restantes (es decir, CO₂ supercrítico) se transfieren a una unidad absorbente para su reciclaje. Un volumen cerrado de este tipo puede construirse de cualquier material adecuado incluyendo, pero sin limitarse a, metales (por ejemplo, acero, aluminio, hierro, etc.), plásticos (por ejemplo, policarbonato, polietileno, etc.), fibra de vidrio (etc.).

35 El término "unidad absorbente" se refiere a cualquier volumen cerrado configurado con materiales que eliminarán contaminantes de un fluido de CO₂ supercrítico. Tales materiales pueden incluir, pero sin limitarse a, carbón vegetal, carbón, gases purificadores, resinas de polímero de plástico y/o cartuchos de filtración que comprenden redes extruidas planas individuales o dobles (Tenax UK LTD, Wrexham, North Wales LL13 9JT, RU). Un volumen cerrado de este tipo puede construirse de cualquier material adecuado incluyendo pero sin limitarse a metales (por ejemplo, acero, aluminio, hierro, etc.), plásticos (por ejemplo, policarbonato, polietileno, etc.), fibra de vidrio (etc.).

40 El término "en comunicación de fluido" se refiere a cualquier medio mediante el que un fluido puede transportarse de una ubicación a otra ubicación. Tales medios pueden incluir, pero sin limitarse a, tuberías, cubos y/o artesas. Tales medios pueden construirse de cualquier material incluyendo, pero sin limitarse a, metales (por ejemplo, acero, aluminio, hierro, etc.), plásticos (por ejemplo, policarbonato, polietileno, etc.), fibra de vidrio (etc.).

Breve descripción de las figuras

La figura 1 presenta un diagrama de flujo de un método para producir material de crustáceos con bajo contenido en fluoruro.

45 La figura 2 presenta una centrífuga longitudinal con una trayectoria de separación extendida. Este ejemplo específico es una centrífuga decantadora horizontal FLOTTWEG SEDICANTER.

La figura 3 representa un ejemplo de una planta de extracción adecuada para su uso en el método dado a conocer en el presente documento. Por ejemplo, la planta comprende una unidad de disolvente (21), un tanque de extracción (22), separadores (23) y adsorbentes (24).

50 La figura 4 presenta datos a modo de ejemplo que muestran las eficacias de extracción de dos ejecuciones diferentes.

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a una composición de aceite de kril rica en fosfolípidos, con bajo contenido en fluoruro, trimetilamina y óxido de trimetilamina.

El aceite de kril comprende lípidos extraídos con disolventes de la biomasa de kril. La biomasa de kril puede ser o bien kril fresco, completo (documento WO2008/060163A1), kril completo congelado (Neptune Technologies & Bioresources Inc., Canadá), kril completo liofilizado (documento JP2215351) o harina de kril (documento US20080274203). Los disolventes usados en la extracción de lípidos de la biomasa de kril se han notificado como acetona + etanol (documentos WO2000/23546; WO2002/102394), etanol + hexano (Enzymotec Ltd), etanol solo (documento JP2215351; Aker BioMarine ASA, Noruega) o codisolvente de CO₂ supercrítico + etanol (documentos US2008/0274203; WO2008/060163). También se ha desarrollado una tecnología libre de disolvente para obtener aceite de kril (documento US20110224450A1). El aceite de kril comprende una fracción lipídica de biomasa de kril en bruto que está esencialmente libre de proteína, hidratos de carbono y/o minerales. El aceite de kril también comprende lípidos neutros (por ejemplo, principalmente triglicéridos), lípidos polares (por ejemplo, principalmente fosfolípidos) y el carotenoide astaxantina. Aunque no es necesario comprender el mecanismo de una invención, se cree que las composiciones de lípidos y/o ácidos grasos del aceite de kril varían dependiendo de la estación.

Gicliotto JC. *et al.*, Food chemistry, Elsevier LTD, NL, vol. 125, n.º 3, 1 de abril de 2011, páginas 1028-1036, XP027477867, ISSN: 0308-8146 dan a conocer la extracción de lípidos a partir de kril que es un crustáceo que comprende fosfolípidos. La publicación enseña que el contenido en fluoruro puede reducirse.

El documento WO 2010/030193 (Emerald Fisheries) describe procedimientos para reducir el contenido en fluoruro en productos producidos a partir de kril. Durante el procedimiento también se producen productos intermedios que se consideran como una composición de aceite de crustáceos que tiene un bajo contenido en fluoruro.

Martin A, Phytothérapie; De la recherche à la pratique, Springer Verlag, PA, vol. 5, n.º 1, agosto de 2007, páginas 6-13 XP019521841, ISSN :1765-2847 da a conocer los beneficios del kril y describe productos producidos a partir del mismo, tales como aceite de kril. Se describe que el aceite es rico en fosfolípidos y proporciona beneficios para la salud. También se describe la reducción del fluoruro.

Se describen métodos de procesamiento de una biomasa de crustáceos que tienen hallazgos inesperados incluyendo, pero sin limitarse a: i) eliminación de la mayoría del exoesqueleto de la biomasa de crustáceos que da como resultado un bajo nivel de fluoruros en una composición de PPC y niveles muy bajos de fluoruro en aceite de kril extraído de la composición de PPC mediante un disolvente apolar (por ejemplo, CO₂ supercrítico) y, opcionalmente, un codisolvente polar (por ejemplo, etanol); ii) un nivel de fluoruros en el aceite de crustáceos que es menor de 0,5 ppm en contraposición al aceite de kril convencional con un contenido en fluoruro de 5 - 100 ppm; iii) el aceite de crustáceos extraído de la PPC mediante CO₂ supercrítico y codisolvente de etanol tiene un color marrón mínimo, lo que sugiere que se ha producido una degradación mínima de astaxantina o formación de productos de oxidación terciarios; iv) un color oscuro/marrón reducido tal como se mide en una escala Hunter L*; v) un contenido en pirrol reducido tal como se mide mediante absorción a 570 nm; v) contenido mínimo de ácidos grasos libres (es decir, por ejemplo, 0,8 g/100 g de aceite (~ 0,8% p/p)) y lisofosfatidilcolina (es decir, por ejemplo, 1,5 g/100 g de aceite (~ 1,5% p/p)). Estos hallazgos sugieren que los lípidos de la biomasa de crustáceos han experimentado una hidrólisis mínima durante las etapas de procesamiento iniciales que producen PPC.

I. Revisión histórica de los métodos de procesamiento de crustáceos

La publicación GB 2240786 da a conocer un método para procesar kril que incluye eliminar una parte del contenido en fluoruro del kril. La eliminación se basa en hacer pasar una corriente eléctrica a través de kril pulverizado. Sin embargo, quedan partículas sólidas que contienen fluoruro en el material.

La publicación US 2011/0224450 (Sclabos Katevas *et al.*) da a conocer un método para obtener aceite de kril a partir de kril en bruto completo usando entre otros cocción, separación mediante decantador y prensado. No se usan disolventes ni extracción.

La publicación WO 2008/060163 (Pronova Biopharma AS) da a conocer un método para obtener aceite de kril usando CO₂ supercrítico y o bien etanol, metanol, propanol o bien isopropanol como codisolvente. Se usa kril completo fresco o precalentado (90°C) como material de alimentación de la extracción.

La publicación WO 02/102394 (Neptune Technologies & Bioresources) da a conocer un método para obtener aceite de kril usando en diferente fases acetona y etanol o por ejemplo acetato de etilo como disolventes. Se usa kril completo congelado como material de alimentación.

La publicación JP 2215351 (Taiyo Fishery) da a conocer un método para obtener aceite de kril usando etanol como disolvente. Se usa kril completo liofilizado como material de alimentación.

La publicación US 2008/0274203 (Aker Biomarine ASA, Bruheim *et al.*) da a conocer un método para obtener aceite de kril a partir de harina de kril usando extracción con fluido supercrítico en un procedimiento de dos fases. La fase 1 elimina el lípido neutro mediante extracción con CO₂ supercrítico puro o CO₂ más el 5% de un codisolvente. La fase 2 extrae los aceites de kril reales usando CO₂ supercrítico en combinación con el 20% de etanol.

Hay varios problemas asociados con estas tecnologías conocidas convencionalmente de extracción de lípidos de kril, incluyendo pero sin limitarse a: i) la biomasa de crustáceos completos contiene partículas de exoesqueleto con

alto contenido en fluoruro que dan como resultado la producción de aceite de crustáceos contaminado con fluoruro; ii) el aceite de crustáceos que tiene un color de tono pardusco puede surgir de la exposición de la astaxantina a un calor excesivo durante el procesamiento de la biomasa de crustáceos. Específicamente, el color marrón puede surgir de la degradación de astaxantina y/o de la acumulación de los productos finales del pardeamiento no enzimático (por ejemplo, productos de degradación de Strecker o pirroles polimerizados). Aunque no es necesario comprender el mecanismo de una invención, se cree que un color marrón que resulta de este proceso no enzimático resulta de la degradación oxidativa debida a una reacción de productos de oxidación de lípidos secundarios con grupos amino de aminoácidos o proteínas creando los denominados productos de oxidación terciarios; iii) la congelación de la biomasa de crustáceos para su transporte a una planta de extracción puede dar como resultado una estabilidad relativa, pero se sabe que se producen algunos cambios en el producto a lo largo del tiempo, por ejemplo, un cambio característico en el kril congelado es una hidrólisis parcial de los lípidos dando como resultado la acumulación de ácidos grasos libres (FFA) que surgen de la degradación de triglicéridos, fosfolípidos y/o lisofosfolípidos, específicamente lisofosfatidilcolina (LPC), que surge de la hidrólisis de la fosfatidilcolina; y iv) el uso de calor y almacenamiento congelado puede inducir la oxidación de lípidos y proteínas en la biomasa de crustáceos, en donde la oxidación primaria conduce a la formación de productos de oxidación secundarios que son volátiles y pueden detectarse en el aceite de kril como malos sabores u olor no deseado; y v) la separación del aceite de kril del material de alimentación es bastante ineficaz, en el que sólo puede extraerse la mitad del aceite.

II. Producción de materiales de crustáceos con bajo contenido en fluoruro

Se describe un método que comprende formar una composición de complejo de fosfolípido-péptido (PPC) a partir de un crustáceo (es decir, por ejemplo, kril) inmediatamente después de que la captura se halla llevado a bordo (por ejemplo, a cubierta) de un barco y/o buque (es decir, por ejemplo, un barco pesquero). El procedimiento de crear la composición de PPC comprende disgregar los crustáceos para dar un material disgregado que comprende partículas más pequeñas (es decir, por ejemplo, entre 1 - 25 milímetros), añadir agua, calentar el material disgregado, añadir enzima(s) para hidrolizar el material disgregado, desactivar la(s) enzima(s), eliminar sólidos (es decir, por ejemplo, exoesqueleto, concha y/o caparazón) del material procesado enzimáticamente para reducir el contenido en fluoruro del material, separar y secar la composición de PPC. Preferiblemente, la composición de PPC se transfiere a una instalación en la costa (es decir, una planta de extracción de aceite de pescado) en donde se separa un aceite de crustáceos con bajo contenido en fluoruro de la composición de PPC usando disolventes incluyendo, pero sin limitarse a, CO₂ supercrítico y/o etanol. Usando extracciones alternativas, también se separan composiciones de PPC desaceitadas, fosfolípidos y/o composiciones de hidrolizado de proteína de la composición de PPC.

- Una ventaja de algunas realizaciones de la invención es que estos productos de crustáceos, como aceite de kril, tienen un bajo contenido en fluoruro. Esto se debe al hecho de que las partículas sólidas del exoesqueleto de crustáceos (es decir, por ejemplo, concha y/o caparazón) se eliminan eficazmente de la masa que va a procesarse.

- Otra ventaja es que el aceite de crustáceos puede separarse eficazmente, casi completamente, del material de crustáceos disgregado (por ejemplo, material de alimentación) durante la extracción. Esto se debe al hecho de que, en el procedimiento de extracción con, por ejemplo, un disolvente de CO₂ supercrítico, el material de alimentación comprende una composición de PPC. Aunque no es necesario comprender el mecanismo de una invención, se cree que los fosfolípidos del material de alimentación están incrustados en una matriz de proteína hidrolizada, lo que significa que la asociación estrecha entre los fosfolípidos y las proteínas hidrófobas/fosforiladas se rompe facilitando así la extracción de los lípidos.

- Una ventaja es que pueden usarse una presión y temperatura relativamente bajas en la extracción, lo que significa menores costes de producción.

- Una ventaja adicional es que se evita el desecho de disolventes residuales, común cuando se usan otros disolventes lipídicos más convencionales, cuando se usa CO₂ supercrítico como disolvente.

- Una ventaja adicional de la invención es que el contenido en fosfatidilserina (PS), ácidos grasos libres (FFA) y lisofosfolcolina (LPC) son muy bajos en los productos finales.

- Una ventaja adicional de la invención es que un producto de aceite de crustáceos con bajo contenido en fluoruro (es decir, por ejemplo, un aceite de kril con bajo contenido en fluoruro) tiene muy poco color marrón. Se cree en la técnica que la aparición de un color marrón en aceite de crustáceos indica que están produciéndose procesos desfavorables durante la fabricación del material de alimentación (por ejemplo, un material de crustáceos disgregado).

A. Procesamiento de crustáceos

Se describe que un método industrial para procesar capturas de crustáceos que comprende varias etapas que comienzan con una eliminación muy temprana y sustancialmente completa del exoesqueleto de los crustáceos (es decir, por ejemplo, la cáscara, el caparazón y/o la concha). Aunque no es necesario comprender el mecanismo, se cree que el exoesqueleto de los crustáceos comprende la gran mayoría del fluoruro en el organismo. En consecuencia, esta etapa da como resultado de ese modo una eliminación sustancial del fluoruro del material de

crustáceos. El método también usa técnicas de centrifugación longitudinal que impide problemas de separación provocados por emulsiones cuando se procesa una materia prima con alto contenido de fosfolípidos.

5 El método se inicia inmediatamente tras subir a cubierta una captura de crustáceos. Es importante que el método se inicie tan pronto como sea posible tras haberse subido a cubierta la captura de crustáceos puesto que el fluoruro comienza a escaparse/difundir inmediatamente desde el exoesqueleto a los jugos y la carne de los crustáceos.

10 Cuando se usa el término “inmediatamente” en relación con el comienzo del procedimiento, esto se refiere al periodo desde la subida a cubierta de la captura de crustáceos y hasta la disgregación inicial de los crustáceos. Este periodo de tiempo debe mantenerse en un mínimo, y no debe exceder preferiblemente 60 minutos, más preferido no debe exceder 30 minutos, incluso más preferido no debe exceder 15 minutos, y debe incluir una transferencia directa de la captura de crustáceos desde la red de arrastre y/o red hasta un disgregador adecuado. Un disgregador del material de crustáceos puede ser una máquina de molienda, trituración, molturación o desmenuzamiento convencional.

15 La captura de crustáceos se carga inicialmente en un aparato de disgregación en donde la captura de crustáceos se somete a molienda, trituración, molturación y/o desmenuzamiento para crear un material de crustáceos disgregado. La temperatura del proceso de disgregación es de alrededor de la temperatura ambiental del agua (es decir, por ejemplo, entre -2 y +1°C, pero más preferiblemente entre +0°C y +6°C) y puede realizarse mediante cualquier método de disgregación conveniente. Este proceso de disgregación también se realiza convencionalmente mediante los métodos de procesamiento conocidos previos, y representa uno de los obstáculos según la técnica anterior porque produce grandes cantidades de partículas de exoesqueleto a partir de los crustáceos mezclando en el material triturado y produciendo una pasta disgregada con un alto contenido en fluoruro. Sin embargo, este alto contenido en fluoruro es uno de los motivos por los que el material de crustáceos procesado de la técnica anterior tiene aplicaciones limitadas y es menos adecuado para alimento, pienso o aditivos de alimentos y piensos correspondientes en comparación con otras materias primas marinas, por ejemplo peces pelágicos.

20

25 El material de crustáceos se separa para dar un tamaño de partícula adecuado para una etapa de separación adicional que no interfiere con las etapas de extracción posteriores. El proceso de disgregación se realiza de manera continua y produce tamaños de partícula de hasta 25 mm, un intervalo de tamaño de partícula preferido es de entre 0,5 - 10 mm y un intervalo de tamaño más preferido es de entre 1,0 - 8 mm.

30 Aunque no es necesario comprender el mecanismo, se cree que esta distribución pequeña del tamaño de partícula representa una de las ventajas de la presente invención porque el fluoruro tiene una tendencia a escaparse del material triturado y mezclarse con el resto de la materia prima. Sin embargo, este proceso de escape tarda tiempo y no es lo suficientemente rápido como para tener un impacto negativo en una etapa de hidrólisis enzimática posterior, siempre que la etapa de hidrólisis se realice dentro de parámetros específicos con respecto al tiempo y condiciones óptimas, o casi óptimas, tales como pH y temperatura y opcionalmente con la adición de cofactores tales como iones específicos dependiendo de las enzimas usadas.

35 La temperatura del material disgregado puede elevarse hasta una temperatura adecuada para la hidrólisis enzimática posterior. Preferiblemente, la temperatura puede aumentarse en el plazo de segundos (por ejemplo, 1-300 segundos, más preferido 1-100 segundos, incluso más preferido 1-60 segundos, lo más preferido 1-10 segundos) posteriormente a la etapa de disgregación para reducir el tiempo de procesamiento y de ese modo impedir la difusión del fluoruro y para preparar el material para la hidrólisis enzimática.

40 Las enzimas pueden añadirse directamente al material disgregado o a través del agua añadida o ambos, antes, durante o después del proceso de disgregación.

45 Las enzimas proteolíticas exógenas (por ejemplo, alcalasa, neutrasa, enzimas derivadas de microorganismos incluyendo, pero sin limitarse a, *Bacillus subtilis* y/o *Aspergillus niger*, y/o enzimas derivadas de especies vegetales) pueden añadirse antes, durante o después de la disgregación, y antes, durante o después del calentamiento del material disgregado. La(s) enzima(s) añadida(s) puede(n) estar en forma de una única enzima o una mezcla de enzimas. Las condiciones de la hidrólisis deben coincidir con las condiciones hidrolíticas óptimas de la(s) enzima(s) añadida(s) y la selección de las condiciones óptimas para la(s) enzima(s) hidrolítica(s) exógena(s) seleccionada(s) la conoce el experto en la técnica. Como ejemplo, la enzima exógena alcalasa que tiene un óptimo de pH de 8, un óptimo de temperatura de 60°C y un tiempo de hidrólisis de 40-120 minutos. Las enzimas seleccionadas, o combinación de enzimas, deben elegirse para reducir las emulsiones provocadas por un alto contenido de fosfolípidos en la materia prima.

50

55 Se establecerá una cantidad eficaz de enzima(s) proteolítica(s) tras un proceso de optimización de productos y procesos que depende de la eficacia de una enzima comercial elegida específica o mezcla de enzimas. Una cantidad típica en peso de enzimas comerciales, como una razón de la cantidad del peso de la materia prima disgregada, es preferiblemente de entre el 0,5% y el 0,05%, más preferiblemente entre el 0,3% y el 0,07% y lo más preferible entre el 0,2% y el 0,09%. Esta etapa de hidrólisis se ayuda mediante enzimas endógenas (naturales) porque se conoce bien la autólisis rápida y no controlada en crustáceos capturados frescos.

Se describe que las enzimas exógenas descomponen el material proteico en la sustancia disgregada así como aumentan la velocidad de y/o aceleran la hidrólisis del material para evitar y/o impedir el escape del fluoruro de la

concha, el caparazón y la cáscara. Estas enzimas hidrolíticas, o una combinación de enzimas hidrolíticas, deben elegirse también con cuidado para reducir la emulsión en el proceso de separación. Por ejemplo, tales enzimas pueden seleccionarse de exo y/o endopeptidasas. Si se usa una mezcla de enzimas, una mezcla de este tipo también puede incluir una o más quitinasas para hacer posteriormente que la(s) fracción/fracciones que contiene(n) quitina sean más propensas al procesamiento posterior. Si se usan quitinasas, debe tenerse cuidado para no aumentar el escape del fluoruro de la concha/cáscara/caparazón de los crustáceos a otras fracciones. Sin embargo, puesto que tal escape de fluoruro tarda tiempo, es posible realizar un tratamiento enzimático de este tipo dentro de los parámetros de tiempo preferidos. Una alternativa más conveniente a la inclusión de quitinasas en la mezcla de enzimas de la etapa de hidrólisis inicial será procesar la fracción que contiene quitina separada posteriormente a la etapa de separación.

Se describe que el escape de fluoruro del material de exoesqueleto triturado al material carnoso triturado se evita completando las etapas de disgregación/hidrólisis en el plazo de un intervalo de tiempo de 100 minutos, preferiblemente en el plazo de 60 minutos, lo más preferido en el plazo de 45 minutos calculado desde la adición de la(s) enzima(s) endógena(s). La cantidad de enzima(s) añadida se refiere al tipo de producto enzimático usado. Como ejemplo puede mencionarse que la enzima alcalasa puede añadirse en una cantidad del 0,1-0,5% (p/p) de la materia prima. Esto debe ponerse en contacto con las enzimas endógenas añadidas puesto que la adición de más enzimas reducirá el intervalo de tiempo de la etapa hidrolítica. Aunque no es necesario comprender el mecanismo, se cree que una duración corta de la hidrólisis reduce el tiempo de difusión del fluoruro de las partículas del exoesqueleto al material proteico.

Posteriormente a, o junto con, la etapa de procesamiento hidrolítico, el material de crustáceos hidrolizado y disgregado se hace pasar a través de un dispositivo de eliminación de partículas que funciona a través de una fuerza gravitacional tal como una centrífuga longitudinal (es decir, por ejemplo, un decantador). Esta primera etapa de separación elimina las partículas finas que contienen una cantidad considerable del fluoruro del material de crustáceos hidrolizado o en hidrólisis para crear una fracción de sólidos. La centrífuga se hace funcionar con una fuerza g de entre 1.000 y 1.800 g, más preferiblemente entre 1.200 y 1.600 g y lo más preferiblemente entre 1.300 y 1.500 g. A través de esta etapa de eliminación de partículas, se elimina una cantidad sustancial de fluoruro de la fracción proteica de crustáceos. La reducción de fluoruro en una base de peso seco en comparación con la harina de crustáceos convencional, con un contenido en fluoruro típico de 1.500 ppm, puede ser de hasta el 50%, incluso más preferido hasta el 85%, lo más preferido hasta el 95%.

La hidrólisis enzimática puede terminarse calentando el material en hidrólisis (incubación) hasta una temperatura por encima de 90°C, preferiblemente entre 92-98°C y lo más preferido entre 92-95°C, antes de, durante o después de la etapa de separación, siempre que la duración de la hidrólisis se encuentre dentro de los límites facilitados anteriormente. La hidrólisis se termina antes, durante o después de la etapa de eliminación de partículas finas, lo más preferido después de la etapa de eliminación de partículas finas. La temperatura de la primera etapa de eliminación de partículas por centrifugación depende de la temperatura de actividad óptima de la enzima (en el caso en el que la etapa de hidrólisis enzimática se termina mediante calentamiento tras la etapa de separación de partículas finas).

El contenido en fluoruro en el material proteico de kril procesado de la técnica anterior (por ejemplo, ~1,500 ppm) tiene aplicaciones limitadas y es menos adecuado para alimento o pienso o aditivos de alimentos o piensos correspondientes. La eliminación del contenido en fluoruro del material de exoesqueleto puede ir seguida por una separación/purificación adicional de materiales tales como quitina, quitosano y astaxantina. Tales procedimientos de aislamiento se conocen dentro de la técnica. También pueden emprenderse etapas para reducir adicionalmente el contenido en fluoruro del material de exoesqueleto aislado usando técnicas que incluyen, pero sin limitarse a, diálisis, nanofiltración, electroforesis u otras tecnologías apropiadas.

La desactivación de enzima(s) hidrolítica(s) puede realizarse de diferentes modos, tal como añadiendo inhibidores, eliminando cofactores (por ejemplo, iones cruciales a través de diálisis), a través de inactivación térmica y/o mediante cualquier otro medio de desactivación. Entre estos, se prefiere la inactivación térmica, calentando el material proteico hasta una temperatura en la que las enzimas hidrolíticas se desnaturalizan y se desactivan. Sin embargo, si se desea un producto en el que las proteínas nativas relevantes no se desnaturalizan, deben seleccionarse otros medios distintos de calentamiento para desactivar las enzimas hidrolíticas.

Una primera centrifugación forma una fracción de material de crustáceos disgregado e hidrolizado desfluorada y una fracción de sólidos (por ejemplo, que contiene partículas de exoesqueleto con alto contenido en fluoruro). Tal como se describe a continuación, la fracción de material de crustáceos disgregado e hidrolizado con bajo contenido en fluoruro puede separarse posteriormente (por ejemplo, mediante una segunda centrifugación) para formar una fracción de composición de complejo de fosfolípido-peptido (PPC) con bajo contenido en fluoruro y una fracción de hidrolizado magra con bajo contenido en fluoruro (CHF), fracción que puede usarse como aditivos de alimentos y/o piensos, y una fracción lipídica que consiste principalmente en lípidos neutros. La subfracción de composición de PPC es rica en lípidos, como una crema suave sin partículas, en la que los lípidos están bien suspendidos dentro de los componentes peptídicos. Esta suspensión da como resultado pequeñas diferencias de densidad entre los diferentes componentes de la composición de PPC haciendo difícil de ese modo separar adicionalmente la composición de PPC con decantadores y/o separadores centrífugos comunes. Esto se acentúa especialmente con

las capturas de crustáceos durante la segunda mitad de la temporada de pesca.

Los separadores centrífugos de discos ordinarios (es decir, que generan fuerza de rotación en el plano X e Y) no funcionan apropiadamente para separar una subfracción de composición de PPC en sus respectivos componentes puesto que los ciclos de vaciado y limpieza necesarios con agua alterarán las zonas de separación. Los procesos de separación por centrifugación convencionales dan como resultado la formación de productos de emulsión no deseados que tienen un alto contenido en fosfolípidos (PL) y bajas concentraciones de materia seca. Los decantadores convencionales no pueden separar la subfracción de composición de PPC en sus respectivos componentes debido a una limitación de baja fuerza g, una zona de separación corta y un entremezclado de fases ligera y pesada en la descarga de la fase pesada de la máquina.

Se describe un método que comprende separar un material de PPC con bajo contenido en fluoruro en subfracciones usando una centrífuga decantadora horizontal con una trayectoria de separación extendida. Véase la figura 2. Las centrífugas horizontales (por ejemplo, que generan una fuerza de rotación en el plano Z) que son útiles para la presente invención comprenden centrífugas decantadoras por convención modificadas. Por ejemplo, entraría una subfracción de composición de PPC en una decantadora ordinaria desde una cuba a través de una tubería de alimentación colocada centralmente en el medio de la zona de separación. En contraposición, cuando se usan centrífugas horizontales tal como se contempla en el presente documento, la subfracción de composición de PPC entra en el extremo y en el lado opuesto de la salida (1). Esta modificación proporciona una mejora significativa en el proceso de separación al proporcionar una zona de clarificación/separación considerablemente más larga que decantadores ordinarios y utiliza la longitud de separación disponible total (2) de la máquina. El impulsor puede conferir altas fuerzas g: 10.000 g para máquinas pequeñas y de 5.000 a 6.000 g para máquinas de alta capacidad, facilitando la separación de subfracciones de composición de PPC muy finas, de asentamiento lento sin las complicaciones del emulsionamiento. La subfracción de composición de PPC se someterá a la fuerza g más alta justo antes de entrar bajo el deflector (3). Las diferentes capas de líquido separadas de la subfracción de composición de PPC se concentran gradualmente a lo largo del eje de la centrífuga horizontal saliendo de ese modo de la máquina bajo el deflector (3) mediante la presión de fuerza g generada por la máquina (4). La separación de la subfracción de composición de PPC en una capa que comprende el 27-30% de materia seca hace que el procesamiento posterior sea eficaz en cuanto al funcionamiento/robustez y también económicamente considerando tanto el rendimiento como los costes de preparación de la materia seca para dar una composición de harina. La separación de la subfracción de composición de PPC también crea una capa que comprende un hidrolizado magro que puede evaporarse para dar un hidrolizado concentrado de más del 60%.

B. Procesamiento de kril

Uno de los métodos se representa como un diagrama de flujo para el procesamiento de kril. Véase la figura 1 que no forma parte de la invención. La función según el método, o el procedimiento se inicia inmediatamente cuando una captura de kril se ha subido al barco. Aunque no es necesario comprender el mecanismo de una invención, se cree que el fluoruro comienza inmediatamente a escaparse/difundir del exoesqueleto quitinoso a la carne y los jugos del kril muerto. "Inmediatamente" significa en este caso un periodo de como máximo 60 minutos, en la práctica, por ejemplo 15 minutos. Durante este periodo la captura de kril se transfiere desde la red de arrastre/red a un disgregador adecuado. En el disgregador, el material de kril se moltura hasta partículas relativamente pequeñas. La disgregación puede realizarse mediante cualquier método conveniente: molienda, trituración, molturación o desmenuzamiento. La temperatura en el proceso de disgregación es de alrededor de la temperatura ambiental del agua, es decir, entre -2°C y +10°C, preferiblemente entre +0°C y +6°C. La disgregación produce una gran cantidad de residuos quitinosos entre el resto del material de kril, contribuyendo de ese modo a un alto contenido en fluoruro.

La distribución del tamaño de partícula del material disgregado de kril es significativa debido al escape de fluoruro mencionado anteriormente de los residuos quitinosos y al resto de la materia prima. Se cree que los tamaños de partícula más pequeños dan como resultado una separación más completa de la fracción de sólidos del material disgregado de kril. Por este motivo el intervalo preferible del tamaño de partícula es de 1,0 - 8 mm. Sin embargo, el proceso de escape es relativamente lento y no tiene tiempo de realizarse durante las fases de proceso posteriores.

A continuación, se añade agua dulce al material disgregado de kril (etapa 11). El volumen/l del agua añadida es, por ejemplo, igual que el peso/kg del material disgregado de kril que va a procesarse durante la fase de proceso posterior de hidrólisis enzimática. La temperatura del material disgregado de kril con el agua añadida se aumenta de manera que es adecuada para la hidrólisis y se añade(n) la(s) enzima(s). El calentamiento se lleva a cabo rápido, en el plazo de como máximo cinco minutos, tras la etapa de disgregación para reducir el tiempo de procesamiento y de ese modo impedir la difusión de fluoruro y preparar el material para la hidrólisis enzimática. La(s) enzima(s) puede(n) añadirse directamente al material disgregado de kril, o a través del agua añadida o ambos, antes, durante o después de la etapa de calentamiento.

El término "hidrólisis" tal como se usa en el presente documento, significa que se hacen roturas en la estructura proteica en la sustancia disgregada, y las cadenas de proteína se vuelven más cortas. Este proceso se controla mediante enzima(s) hidrolítica(s). Por ejemplo, pueden usarse una o más enzimas proteolíticas exógenas (por ejemplo alcalasa, neutrasa y enzimas derivadas de microorganismos o especies vegetales) en el proceso. Pueden añadirse cofactores tales como iones específicos dependiendo de las enzimas usadas. La(s) enzima(s)

seleccionada(s) también puede(n) elegirse para reducir las emulsiones provocadas por un alto contenido de fosfolípidos en la materia prima. Además de la temperatura, la hidrólisis tiene lugar dentro de un pH óptimo o casi óptimo y un tiempo suficiente (por ejemplo, para la enzima exógena alcalasa el pH óptimo es de 8, la temperatura óptima de 60°C y el tiempo de hidrólisis de 40-120 minutos).

- 5 La cantidad de enzima(s) proteolítica(s) puede establecerse tras una optimización de procesos/productos, y depende naturalmente de la eficacia de la enzima elegida o mezcla de enzimas. Una razón típica del peso de las enzimas comerciales añadidas con respecto al peso del material disgregado de kril es de entre el 0,05% y el 0,5%, preferiblemente entre el 0,1% y el 0,2%. Se sabe que el kril capturado fresco padece una autólisis rápida y no controlada, o la destrucción de las células por enzimas endógenas (naturales), motivo por el que el tratamiento descrito en el presente documento debe realizarse sin retrasos cuando la captura no está congelada.

10 La hidrólisis enzimática también provoca la eliminación de las uniones entre el tejido blando del kril y el exoesqueleto. Si se usa una mezcla de enzimas, la mezcla también puede incluir una o más quitinasas para facilitar el procesamiento adicional de las fracciones que contienen quitina. Las quitinasas son enzimas que descomponen los enlaces glicosídicos en la quitina.

- 15 La hidrólisis enzimática se termina en el plazo de 100 minutos desde la adición de la(s) enzima(s) endógena(s). La duración preferida Δt de la hidrólisis es más corta, por ejemplo 45 minutos (etapa 12). Una duración de la hidrólisis relativamente corta es importante, porque en ese caso se reduce la difusión del fluoruro desde las partículas de exoesqueleto hasta el otro material.

- 20 La hidrólisis se detiene desactivando la(s) enzima(s) hidrolítica(s) (etapa 13). Hay muchos modos de desactivar las enzimas. En el presente documento se usa el térmico: la temperatura del material procesado enzimáticamente se aumenta por encima de 90°C, preferiblemente entre 92-98°C, en cuyo caso las enzimas hidrolíticas se desnaturalizan. En la práctica, la desactivación de la(s) enzima(s) hidrolítica(s) puede realizarse también durante o después de la eliminación de partículas sólidas.

- 25 Las partículas sólidas (por ejemplo, exoesqueleto de kril) se eliminan del material de kril disgregado e hidrolizado enzimáticamente mediante pase a través de un dispositivo basado en la fuerza centrífuga tal como una centrífuga horizontal y/o decantador convencional (etapa 14). Aunque no es necesario comprender el mecanismo de una invención, se cree que estas partículas sólidas, o sólidos, se originan a partir del exoesqueleto de kril y, tal como se mencionó, contienen una cantidad considerable del fluoruro. El decantador se hace funcionar con una fuerza de entre 1.000 y 1.800 g, preferiblemente entre 1.300 y 1.500 g. A través de esta etapa de eliminación de partículas, se elimina una cantidad sustancial de fluoruro, más del 90%, del material de kril. La temperatura en el decantador es, por ejemplo, de 90°C, y si la desactivación de la(s) enzima(s) se realiza tras la eliminación de sólidos, la temperatura en el decantador se aumenta entonces hasta, por ejemplo, 93°C.

- 30 A continuación, el material de kril disgregado e hidrolizado con bajo contenido en fluoruro se modifica mediante pase a través de una trayectoria de separación extendida centrífuga horizontal (es decir, por ejemplo, un instrumento Sedicanter). Véanse la figura 1 etapa 15 y la figura 2. En el instrumento Sedicanter, el material de kril disgregado e hidrolizado se separa en una porción grasa valiosa, o fracción de material de PPC (complejo de fosfolípido-péptido), y una porción de CHF (fracción de hidrolizado concentrada).

- 35 La separación del material de kril disgregado e hidrolizado en el material de PPC es difícil debido a las pequeñas diferencias de densidad dentro del material de kril. El instrumento Sedicanter es una centrífuga horizontal modificada que incluye una zona de clarificación/separación horizontal larga y que genera altas fuerzas centrífugas (de 5.000 a 6.000 g). Estas características facilitan la separación de PPC finos, de asentamiento lento sin emulsionamiento. Esto último es un problema en las centrífugas ordinarias con una zona de separación corta y menores fuerzas, y porque se usa agua en los ciclos vaciado y limpieza. La concentración de materia seca del material de PPC, presurizado a partir del instrumento Sedicanter, es del 27-30%.

- 40 El material de PPC puede secarse entonces para dar una harina para evitar la oxidación de los lípidos. Figura 1, etapa 16. El proceso de secado es suave con una baja temperatura (0-15°C, preferiblemente 2-8°C) y condiciones inertes, lo que proporciona un estrés oxidativo reducido sobre los ácidos grasos omega-3 poliinsaturados de cadena larga. Un proceso de liofilización también sería adecuado puesto que esto evita un sobrecalentamiento del producto.

- 45 La harina de kril con PPC, o más brevemente PPC, se envasa entonces en bolsas herméticas bajo atmósfera de nitrógeno para su uso directo posterior y continuación del proceso.

50 En la tabla I se muestra a continuación un equilibrio de masas típico del kril antártico magro en bruto procesado:

Tabla I: Equilibrio de masa típico del kril antártico

Materia	A partir de 500 kg de kril en bruto más agua	Peso seco
Material de PPC húmedo	80 kg	28%
Harina de PPC	25 kg	97%
Hidrolizado	770 kg	6%
CHF	78 kg	60%
Partículas que contienen fluoruro	45 kg	40%
Aceites neutros	<5 kg	

El contenido en fluoruro, antes de la separación, en el material de kril disgregado e hidrolizado es de 1,2 g/kg, mientras que, después de la separación, el PPC es de como máximo 0,5 g/kg y normalmente de 0,3 g/kg. Por tanto, se han eliminado dos tercios del fluoruro.

5 Cuando se procesa adicionalmente el PPC, los componentes pueden aislarse mediante una extracción. En esta fase, puede usarse un disolvente. Figura 1, etapa 17. Por ejemplo, para obtener aceite de kril a partir del PPC, puede utilizarse CO₂ supercrítico y/o etanol, o bien por separado o bien en combinación. El proceso de extracción produce, además del aceite de kril, un hidrolizado de proteína (etapa 18).

10 La compresión y el calentamiento de un material (por ejemplo, dióxido de carbono o dimetil éter) por encima de su temperatura y presión supercríticas dan como resultado un fluido supercrítico. La densidad es intermedia entre un líquido y un gas y puede variar en función de la temperatura y presión. Por tanto, la solubilidad de los fluidos supercríticos puede ajustarse de modo que pueden obtenerse extracciones selectivas. Debido a las propiedades similares al gas, pueden lograrse extracciones rápidas en comparación con extracciones líquidas ya que las velocidades de difusión son superiores. El CO₂ es un fluido supercrítico comúnmente utilizado ya que sus parámetros supercríticos pueden alcanzarse fácilmente. Por ejemplo, un informe ha demostrado un bajo rendimiento de fosfolípidos de kril usando una extracción con fluido supercrítico a una presión de 500 bar y una temperatura de 100°C. Yamaguchi (1986). Un segundo informe proporciona datos sobre condiciones de proceso específicas, que incluyen intervalos de presión y temperatura (por ejemplo, de 300 a 500 bar y de 60 a 75°C). Estos datos son de un proceso a escala piloto en el que se logró una extracción del 84 al 90% de los lípidos totales del kril. Bruheim *et al.*, publicación de solicitud de patente estadounidense número 2008/0274203. Además, el CO₂ supercrítico no es inflamable, es barato e inerte, en el que tales factores son relevantes cuando se considera la aplicabilidad industrial. El ser inerte da como resultado un bajo grado de oxidación de compuestos lábiles durante la extracción. El CO₂ también tiene una baja tensión superficial, lo que es una ventaja de modo que el medio de extracción puede penetrar en el material eficazmente. Con el fin de extraer sustancias más polares, el CO₂ puede mezclarse con un disolvente polar tal como etanol. El nivel de modificador puede variarse para proporcionar una selectividad extra también.

25 En consecuencia, los procedimientos de extracción con fluido supercrítico a escala industrial actualmente disponibles usando altas temperaturas y presiones han dado como resultado una baja eficacia de extracción de harina de kril convencional proporcionando de ese modo un rendimiento de aceite insuficiente para proporcionar una solución viable comercialmente para la extracción de kril. Además, estos procedimientos de extracción actualmente disponibles no solucionan los problemas comentados en el presente documento con respecto a proporcionar composiciones de aceite y/o harina con bajo contenido en fluoruro mejoradas.

30 Por tanto, se han desarrollado los métodos de extracción con disolvente mejorados descritos en el presente documento. Se describe que se usan codisolventes con CO₂ supercrítico o dimetil éter supercrítico o bien solos o bien en diversas combinaciones de etanol, hexano, acetona. Por ejemplo, si se usa etanol solo como disolvente de extracción, se ha observado que el material de kril es menos selectivo que la extracción con CO₂ supercrítico. Pronova *et al.*, documento WO 2008/060163 A1. Como resultado, se extraen sustancias no deseadas en el aceite de kril dando como resultado la necesidad de procesamiento/limpieza adicionales tras la extracción. Además, el aceite de kril extraído sólo con etanol tiende a tener mayor viscosidad y color más oscuro que es independiente del contenido en astaxantina del aceite.

40 Se describen métodos que tienen hallazgos inesperados incluyendo pero sin limitarse a: i) se extrajo PPC usando bajas presiones (es decir, por ejemplo, entre 177 y 300 bar) y bajas temperaturas (es decir, por ejemplo, entre 33 y 60°C); y ii) se produjo un alto rendimiento de extracto lipídico (datos disponibles). Parece que la harina de kril que comprende proteína hidrolizada permite una extracción más fácil de los lípidos asociados en particular la fracción rica en fosfolípidos del aceite de kril.

45 Los datos presentados en el presente documento demuestran que se encontró que el CO₂ supercrítico era un método de extracción selectivo ya que producía extractos de alta pureza que contenían triglicéridos, fosfolípidos y astaxantina con un color marrón mínimo y calidad organoléptica superior en comparación con aceites de kril producidos mediante extracción sólo con etanol y/o extracción con acetona + etanol. El color marrón del aceite de kril se considera que no es deseable. El origen exacto del color marrón se desconoce pero se cree que está asociado con la oxidación de lípidos del kril durante la fabricación de fosfolípidos de harina de kril y/o la degradación del carotenoide astaxantina.

50

Las propiedades de un fluido supercrítico de este tipo pueden alterarse variando la presión y temperatura, permitiendo la extracción selectiva de componentes. Las condiciones de extracción para CO₂ supercrítico están por encima de la temperatura crítica de 31°C y presión crítica de 74 bar. La adición de modificadores puede alterar ligeramente estos valores. Por ejemplo, pueden extraerse lípidos neutros y colesterol de la yema de huevo con presiones de CO₂ de hasta 370 bar y una temperatura de hasta 45°C, mientras que el uso de una temperatura superior, por ejemplo 55°C, daría como resultado un aumento de la tasa de extracción de fosfolípidos. El CO₂ tiene una alta aplicabilidad industrial porque no es inflamable, es barato e inerte. El ser inerte da como resultado una baja oxidación de compuestos lábiles durante la extracción.

Tal como se mencionó, o bien el CO₂ supercrítico o bien el dimetil éter supercrítico es fluido. Su densidad es intermedia entre un líquido y un gas y puede variar en función de la temperatura y presión. Por tanto, la solubilidad de los fluidos supercríticos puede ajustarse de modo que puedan obtenerse extracciones selectivas. Debido a las propiedades similares al gas, pueden lograrse extracciones rápidas en comparación con extracciones líquidas. En el presente método la extracción es eficaz; se separa incluso el 95% del aceite de kril existente en el PPC. Aunque no es necesario comprender el mecanismo, se cree que los fosfolípidos del material de alimentación están incrustados en una matriz de proteína hidrolizada, lo que significa que se rompe la asociación estrecha entre los fosfolípidos y las proteínas hidrófobas/fosforiladas, facilitando así la extracción de los lípidos. Además, se transfiere una cantidad mínima de contenido en fluoruro al aceite durante el proceso de extracción con CO₂. Por ejemplo, el contenido en fluoruro del PPC es de 0,3 g/kg, pero tras la extracción con CO₂ el contenido en fluoruro del aceite de kril es de menos de 0,5 mg/kg.

Alternativamente, cuando se usa sólo CO₂ supercrítico como disolvente, pueden separarse triglicéridos y/o aceite neutro de la subfracción de composición de PPC. Figura 1, etapa 19. En una realización, la extracción sólo con CO₂ supercrítico también genera una composición de "PPC desaceitado" con bajo contenido en fluoruro. Aunque no es necesario comprender el mecanismo de una invención, se cree que el PPC desaceitado es la parte más valiosa de la subfracción de composición de PPC. Después de eso la composición de PPC desaceitada puede extraerse usando etanol como disolvente, en el que también se genera una subfracción de fosfolípidos y una fracción de hidrolizado de proteína. Véase la figura 1, etapa 1A.

Se describe un sistema que comprende una planta de extracción, que incluye pero no se limita a, una unidad de disolvente 21, un tanque vertical 22, separadores 23 y adsorbentes 24. Véase la figura 3. Se alimentan CO₂ normal y un posible codisolvente a la unidad de disolvente, que comprende una bomba para generar una determinada presión (p) y un calentador para generar una determinada temperatura (T). El CO₂ supercrítico con un posible codisolvente se alimentan entonces al extremo inferior del tanque 22. El material de alimentación, en este caso el PPC, se alimenta al tanque por medio de una bomba. El material afectado por el disolvente fluye fuera del extremo superior del tanque. Los separadores 22 separan el resultado de la extracción, por ejemplo aceite de kril, a la salida del sistema. Si se usa etanol como codisolvente, sigue al extracto apropiado y tiene que eliminarse por evaporación. El CO₂ continúa su circulación hasta los adsorbentes 23, en donde se limpia, y después de eso regresa a la unidad de disolvente 21.

Se describen composiciones de PPC con bajo contenido en fluoruro que incluyen, pero sin limitarse a, lípidos polares (~ 43% p/p) y/o lípidos neutros (~ 46% p/p). Por ejemplo, los lípidos neutros del PPC pueden oscilar entre el 40 - 50% (p/p). Se describe que los lípidos polares incluyen, pero no se limitan a, fosfatidiletanoamina (~ 3% p/p), fosfatidilinositol (~ < 1% p/p), fosfatidilserina (~ 1% p/p), fosfatidilcolina (~ 38% p/p) y/o lisofosfatidilcolina (~ 2% p/p). Se describe que los lípidos neutros incluyen, pero no se limitan a triacilglicerol (~ 40% p/p), diacilglicerol (~ 1,6% p/p), monoacilglicerol (~ < 1% p/p), colesterol (~ 2% p/p), ésteres de colesterol (~ 0,5% p/p), ácidos grasos libres (~ 2% p/p) y grasa (~ 48% p/p). Se describe que la grasa de lípidos neutros comprende el 75% de ácidos grasos. Se describe que los ácidos grasos de la grasa de lípidos neutros incluyen, pero no se limitan a, ácidos grasos saturados (~ 28% p/p), ácidos grasos monoenoicos (~ 22% p/p), ácidos grasos poliinsaturados n-6 (~ 2% p/p) y/o ácidos grasos poliinsaturados n-3 (~ 26% p/p). Véase el ejemplo XIII.

Se han creado perfiles de fosfolípidos para evaluar el aceite de kril con bajo contenido en fluoruro extraído mediante los métodos descritos en el presente documento. Por ejemplo, la tecnología de resonancia magnética nuclear ha determinado que la fosfatidilcolina es el componente de fosfolípidos más grande del aceite de kril y su proporción es relativamente estable. Varias muestras de aceite de kril se sometieron a análisis independiente. Véase el ejemplo XII.

La presente invención comprende una composición de aceite de kril que comprende fosfolípidos y menos de 0,5 ppm de fluoruro y menos del 0,001% (p/p) de trimetilamina y menos del 0,02% (p/p) de óxido de trimetilamina y en donde dichos fosfolípidos son entre el 39-52% en peso. La presente invención contempla un aceite de kril con bajo contenido en fluoruro que comprende el 39 - 52% (p/p) de fosfolípidos. En una realización, los fosfolípidos comprenden fosfatidilcolina que oscila entre el 65 - 80% (p/p).

Se describe que los fosfolípidos comprenden alquilacilfosfatidilcolina que oscila entre el 6 - 10% (p/p). Se describe que los fosfolípidos comprenden fosfatidilinositol que oscila entre el 0,3 - 1,6% (p/p). Se describe además que los fosfolípidos comprenden fosfatidilserina que oscila entre el 0,0 - 0,7 % (p/p). En una realización, los fosfolípidos comprenden lisofosfatidilcolina que oscila entre el 2,4 - 19% (p/p). También se describe que los fosfolípidos

comprenden lisoacilalquilfosfatidilcolina que oscila entre el 0,6 - 1,3% (p/p). Se describe que los fosfolípidos comprenden fosfatidiletanolamina que oscila entre el 1,4 - 4,9% (p/p). Se describe que los fosfolípidos comprenden alquilacilfosfatidiletanolamina que oscila entre el 0,0 - 2,1 % (p/p). Se describe que los fosfolípidos comprenden una combinación de cardiolipina y N-acilfosfatidiletanolamina que oscila entre el 1 - 3% (p/p). Se describe que los fosfolípidos comprenden lisofosfatidiletanolamina que oscila entre el 0,5 - 1,3% (p/p). Se describe además que los fosfolípidos comprenden lisoalquilacilfosfatidiletanolamina que oscila entre el 0,0 y el 0,3% (p/p). En una realización la composición de aceite comprende además triglicéridos, lípidos neutros, el 20 - 26% en peso de ácidos grasos omega-3 (por ejemplo, n-3) y al menos el 0,8% en peso de ácidos grasos libres.

Tal como se describió anteriormente, la extracción con disolvente apolar de un aceite de crustáceos con bajo contenido en fluoruro da como resultado la producción de una composición de complejo de fosfolípido-proteína desaceitado con bajo contenido en fluoruro (PPC desaceitado). Aunque no es necesario comprender el mecanismo se cree que el complejo de fosfolípido-proteína desaceitado con bajo contenido en fluoruro comprende un contenido en fluoruro similar al complejo PPC con bajo contenido en fluoruro (por ejemplo, entre 200 - 500 ppm). Un análisis de componentes de PPC desaceitado incluye, pero no se limita a, lípidos polares (~ 69% p/p) y/o lípidos neutros (~ 20% p/p). Se describe que los lípidos polares incluyen, pero no se limitan a, fosfatidiletanoamina (~ 4,2% p/p), fosfatidilinositol (~ < 1% p/p), fosfatidilserina (~ < 1% p/p), fosfatidilcolina (~ 62% p/p) y/o lisofosfatidilcolina (~ 2% p/p). Se describe que los lípidos neutros incluyen, pero no se limitan a triacilglicerol (~ 17% p/p), diacilglicerol (~ 0,6% p/p), monoacilglicerol (~ < 1% p/p), colesterol (~ 1% p/p), ésteres de colesterol (~ 0,5% p/p), ácidos grasos libres (~ 1% p/p) y grasa (~ 35% p/p). Se describe que la grasa de lípidos neutros comprende el 69% de ácidos grasos. Se describe que los ácidos grasos de grasa de lípidos neutros incluyen, pero no se limitan a, ácidos grasos saturados (~ 21% p/p), ácidos grasos monoenoicos (~ 13% p/p), ácidos grasos poliinsaturados n-6 (~ 2% p/p) y/o ácidos grasos poliinsaturados n-3 (~ 31% p/p). Véase el ejemplo IX.

III. Producción de material de crustáceos con bajo contenido en trimetilamina

La trimetilamina (TMA) es un compuesto orgánico que comprende una fórmula química de $N(CH_3)_3$. La TMA es una amina terciaria incolora, higroscópica e inflamable que puede tener un fuerte olor "a pescado" en bajas concentraciones y un olor similar al amoníaco a concentraciones superiores. Puede producirse TMA comercialmente y es también un subproducto natural de la descomposición de plantas y/o animales. Es la sustancia responsable principalmente del olor asociado a menudo con pescado podrido, algunas infecciones y mal aliento. También está asociado con la toma de dosis grandes de colina y carnitina.

Químicamente, la TMA comprende una base nitrogenada y puede protonarse fácilmente para dar un catión de trimetilamonio. El cloruro de trimetilamonio es un sólido incoloro higroscópico preparado a partir de ácido clorhídrico. La trimetilamina es un buen nucleófilo, y esta reacción es la base de la mayoría de sus aplicaciones.

El N-óxido de trimetilamina (TMAO) es un compuesto orgánico que comprende una fórmula química de $(CH_3)_3NO$. Este sólido incoloro se encuentra habitualmente como dihidrato. El TMAO es un producto de oxidación de TMA, un metabolito común en animales. El TMAO es también un osmolito que se encuentra en peces de agua salada, tiburones y rayas, moluscos y crustáceos. Además, el TMAO puede funcionar como estabilizador de proteínas que puede servir para contrarrestar la urea, el osmolito principal de tiburones, rajiformes y rayas. El TMAO tiene una alta concentración en crustáceos y peces de mares profundos, en donde puede contrarrestar los efectos desestabilizantes de proteínas de la presión. Yancey, P. "Organic osmolytes as compatible, metabolic, and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses" J. Exp. Biol. 208(15):2819-2830 (2005). El TMAO se descompone en trimetilamina (TMA), que es el odorante principal que es característico del marisco en degradación.

La eliminación de compuestos de TMA/TMAO de productos de crustáceos confiere una ventaja útil ya que estos compuestos contribuyen al olor fuerte, desagradable de los aceites de crustáceos. En consecuencia, compuestos con bajo contenido en TMA/TMAO tienen una aplicabilidad industrial mejorada en comparación con aceites de crustáceos preparados tradicionalmente.

Se describe un método que comprende extraer un complejo de proteína-péptido con bajo contenido en fluoruro (PPC) que es una materia prima adecuada para la producción de aceite de kril mediante extracción con cualquier combinación de disolventes incluyendo, pero sin limitarse a, etanol, acetona, acetato de etilo, dióxido de carbono o dimetil éter para producir un producto de crustáceos con bajo contenido en fluoruro-bajo contenido en trimetilamina. En una realización, el producto de crustáceos con bajo contenido en fluoruro-bajo contenido en trimetilamina comprende un aceite. Se describe que el producto de crustáceos con bajo contenido en fluoruro-bajo contenido en trimetilamina comprende un PPC desaceitado.

Se ha notificado anteriormente dimetil éter (DME) como disolvente de extracción para ácidos grasos poliinsaturados, pero no para la preparación de productos con bajo contenido en TMA. Catchpole *et al.* "Extraction Of Highly Unsaturated Lipids With Liquid Dimethyl Ether", documento WO 2007/136281. Cuando el DME está en una forma supercrítica, el disolvente tiene un poder de disolvente suficiente para extraer fosfolípidos dando como resultado extracciones rápidas y suaves. El DME puede usarse sobre materias primas húmedas y puede hacerse funcionar a bajas presiones en comparación con otros fluidos supercríticos tales como CO_2 . Se describe un producto de

extracción de crustáceos que comprende aceites de kril con aceite de crustáceos con un bajo contenido en TMA/TMAO. En una realización, el aceite de crustáceos con un bajo contenido en TMA/TMAO es un aceite de kril.

IV. Composiciones formuladas

Se describen composiciones que comprenden PPC de crustáceos con bajo contenido en fluoruro.

- 5 Se describe un método para formular una composición que comprende un PPC de crustáceos con bajo contenido en fluoruro y/o un PPC desaceitado de crustáceos con bajo contenido en fluoruro y/o un hidrolizado de proteína tal como se describe en el presente documento. Se describe que la composición es un polvo. Se describe que la composición es un comprimido. Se describe que la composición es una cápsula. Se describe que el método comprende además mezclar el polvo con un producto alimenticio. Se describe que el mezclado comprende además
- 10 ácidos grasos omega-3 poliinsaturados microencapsulados. Se describe que el mezclado comprende además óxido de zinc. Se describe además que el mezclado comprende además péptidos marinos. Se describe que el mezclado comprende además al menos un aminoácido complementario.

Parte experimental

Ejemplo I

15 Producción de aceite de kril con bajo contenido en fluoruro

El material de alimentación, se suministraron gránulos de “harina de kril Emerald” (Olymeg® o PPC con bajo contenido en fluoruro preparado tal como se describe en el presente documento), en una bolsa de plástico sellada que contenía 25 kg. El material de alimentación se mantuvo congelado hasta que se usó en las extracciones. Los gránulos tienen una distribución de tamaño normalmente en el intervalo de 2 a 5 mm, pero también estaban presentes varios fragmentos finos. Los gránulos son grasientos al tacto pero todavía se rompen bajo compresión en vez extenderse.

25 Lotes de 5 kg de material de alimentación en forma granular, tal como se procesa usando CO₂ supercrítico como disolvente y etanol de calidad para alimento azeotrópico como codisolvente, siendo el peso del etanol el 23% del peso del CO₂. Se presurizó previamente la planta a la presión de funcionamiento con CO₂ sólo, y se añadió etanol cuando comenzó la circulación de CO₂. La razón de disolvente con respecto a material de alimentación era de 25:1 o mayor y la razón de codisolvente con respecto a material de alimentación era de 5:1. Se llevaron a cabo ejecuciones en dos condiciones de extracción; 300 bar a 60°C, y 177 bar a 40°C. Véase la tabla II.

Tabla II - Condiciones de extracción de aceite de kril

	<u>Ejecución 1</u>	<u>Ejecución 2</u>
Masa de alimentación (g, tal como se recibe)	5000,5	5000,9
Presión de extracción (bar)	300	177
Temperatura de extracción (°C)	60	33
Presión en el primer separador (bar)	90	90
Temperatura en el primer separador (°C)	41	41
Presión en el segundo separador (bar)	48-50	48-50
Temperatura en el segundo separador (°C)	39	39
CO ₂ usado con codisolvente de etanol (kg)	132,6	134,9
CO ₂ adicional al final de la ejecución (kg)	33,1	44,5
Etanol total usado (kg)	31,65	32,19

30 Se hizo pasar el material de aceite de kril extraído a través de dos recipientes de separación en serie, mantenidos a 90 bar y 45-50 bar respectivamente. Se agrupó el material de aceite de kril final recogido de ambos separadores y se evaporó el etanol. El material de alimentación residual comprende un material de alimentación desaceitado (por ejemplo, PPC desaceitado) que tiene un contenido en lípidos reducido en comparación con el material de alimentación de partida. Véase el ejemplo IX.

35 Tras la evaporación del etanol, se generaron curvas de extracción acumulada de aceite de kril para tanto la ejecución 1 como la ejecución 2 analizando independientemente cada muestra tomada durante las ejecuciones de extracción. Véase la tabla III.

ES 2 666 048 T3

Tabla III - Rendimientos y puntos de muestreo de la extracción de aceite de kril progresiva

Número de muestra	1	2	3	4	5	6	Total
<u>Ejecución 1</u>							
CO ₂ acumulado (kg/kg de alimentación)	5,5	9,1	13,4	17,8	22,0	33,1	33,1
Aceite extraído (g, seco)	1137	398	282	135	78	86	2115
<u>Ejecución 2</u>							
CO ₂ acumulado (kg/kg de alimentación)	5,6	9,1	13,5	17,5	21,5	34,4	34,4
Aceite extraído (g, seco)	715	496	368	220	149	129	2077

Se logró un rendimiento total del 41-42% en peso del material de alimentación para todas las ejecuciones. Las ejecuciones llevadas a cabo a 300 bar y 60°C tenían una tasa de extracción inicial superior. Las curvas indican que la extracción es prácticamente completa en el número de muestra 5 tras un uso de CO₂ acumulado de entre 21,5 - 22,0 kg por kg de material de alimentación. Se logra la extracción máxima estimada en un punto en el que la razón de CO₂:alimentación es de 26,5:1. Véase la figura 3 (la extracción máxima estimada se marca mediante una flecha). La razón de etanol azeotrópico con respecto a CO₂ era de 0,24:1 para las ejecuciones a 300 bar, y ligeramente superior a 0,26:1 para la ejecución a presión inferior.

5 Este método de producción de aceite de kril dio como resultado la extracción casi completa de lípidos totales de la harina de kril (por ejemplo, el 95% de lípidos neutros y el 90% de fosfolípidos). El rendimiento final fue similar para las ejecuciones a tanto presión alta como baja, pero los lípidos neutros se extraían más rápidamente a presión superior. La tasa de extracción de fosfolípidos era similar en ambas condiciones de extracción. Tal como se detalla a continuación, en este proceso de extracción, los lípidos totales de aceite de kril agrupados tenían un nivel de fosfolípidos global justo por encima del 40% en peso y tanto fosfatidilinositol como fosfatidilserina apenas se extraían.

Se determinaron entonces los perfiles de fosfolípidos de las diversas composiciones de material de kril usando técnicas de cromatografía en columna tradicionales. Véase la tabla IV.

Tabla IV - Perfiles de fosfolípidos comparativos de composiciones de kril (ejecución 1)

Muestra	Olymeg 10071199	Extracto 1	Extracto 2	Extracto 3	Extracto 4	Extracto 5	Extracto 6	Residuo (parte superior)	Residuo (parte inferior)
% en peso de PL totales									
PC	70,1	80,4	77,1	76,9	75,9	73,5	72,7	40,2	32,5
AAPC	8,5	8,0	9,0	9,8	9,1	10,6	9,0	7,5	7,8
PI	1,8				0,7	0,6	0,6	6,2	10,1
PS	1,0							5,5	8,1
LPC	6,9	4,6	5,6	5,7	6,0	6,8	7,5	13,4	8,9
LAAPC	1,7	1,2	1,2	1,0	1,3	1,2	1,4	3,2	2,6
PE	5,3	3,6	4,0	3,5	3,8	3,5	4,5	9,4	9,4
EPLAS	0,6	0,0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,3	1,0	2,2
AAPE	2,0	1,1	1,5	1,3	1,6	1,6	2,0	4,4	4,9
LPS								0,7	1,9
CL/NAPE	1,0	0,9	0,7	0,8	0,8	1,2	1,6	4,2	5,7
LPE	0,8	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	3,2	4,5
PL totales (% en peso de lípido)	40,88							81,46	80,96

Rendimiento de lípidos (% en peso)	44,7							4,9	5,9
PL totales (% en peso de muestra)	18,3	26,68	46,03	57,94	71,34	76,13	78,50	4,0	4,8

La primera columna muestra los fosfolípidos específicos que se analizaron. La segunda columna muestra el perfil de fosfolípidos del material de alimentación de partida (por ejemplo, un PPC con bajo contenido en fluoruro preparado tal como se describe en el presente documento, u "Olymeg®"). Las columnas tres - ocho (extractos 1 - 6) muestran el perfil de fosfolípidos de cada muestra de aceite de kril tomada durante el proceso de extracción tal como se describió anteriormente. Las últimas dos columnas muestran el perfil de fosfolípidos del material de alimentación extraído residual muestreado a partir de o bien la parte superior y/o bien la parte inferior de la columna de extracción de fosfolípidos.

Los datos muestran que el fosfolípido principal en las muestras de aceite de kril extraído es fosfatidilcolina (PC), que oscila entre el 72,7% y el 80,4% de los fosfolípidos totales, incluyendo contribuciones de tanto alquililfosfatidilcolina (AAPC) como lisofosfatidilcolinas (por ejemplo, LPC y/o LAAPC). Están presentes cantidades menores de fosfatidiletanolamina (PE) en tanto el material de alimentación (columna 1, ~,3%) como en las muestras de extracto de aceite de kril (columnas 3 - 8), ~ 3,5 - 4,5%). También están presentes formas de alquilil y liso de PE (AAPE, LPE) en el material de alimentación y los extractos de aceite de kril. Están presentes fosfatidilinositol (PI) y fosfatidilserina (PS) en el material de alimentación, pero debido a que son escasamente solubles en etanol, estos fosfolípidos apenas se extraen y, por tanto, se concentran en el residuo de material de alimentación extraído (por ejemplo, teniendo un nivel superior en el PPC residual en comparación con el material de alimentación, véanse las columnas 9 y 10).

El análisis adicional determinó las proporciones de componentes lipídicos relativas globales del aceite de kril extraído. Véase la figura V.

Tabla V - Componentes lipídicos principales del aceite de kril extraído (% p/p)

	TAG	Lípidos polares	Esteroles	FFA	Astaxantina	Lípidos totales
Ejecución 1	40,3	46,9	1,9	ND	0,05	92,2
Ejecución 2	42,1	50,2	2	ND	0,05	95,3

Los datos muestran: i) una ausencia relativa de ácidos grasos libres (FFA); ii) menos del 2% de esteroles; iii) el 40% en peso de triacilglicéridos (TAG); y iv) aproximadamente el 50% de fosfolípidos (por ejemplo, lípidos polares). Aunque no se detectaron FFA (ND) en este ejemplo particular, se cree que los aceites de kril extraídos pueden comprender entre el 0,01 - 0,1% de FFA de lípidos totales. Tal como se describió anteriormente, el proceso de extracción da como resultado un rendimiento de entre el 92,2 - 95,3% de los lípidos totales del material de alimentación.

El método y los productos según la invención se han descrito anteriormente. Naturalmente, el método puede variar en sus detalles con respecto a los presentados. La idea de la invención puede aplicarse de diferentes modos dentro de los límites descritos en el presente documento.

Ejemplo II

Eficacia de extracción de lípidos

Este ejemplo demuestra una extracción de lípidos analítica a modo de ejemplo con el método de Soxhlet que compara harina de kril convencional con una harina de kril con bajo contenido en fluoruro (por ejemplo, PPC con bajo contenido en fluoruro) tal como se describe en el presente documento. El método de Soxhlet es un método convencional en la determinación cuantitativa del contenido en grasa de alimentos y piensos y, por tanto, puede usarse como método de referencia para determinar la capacidad de extracción de diversas harinas de kril. Por ejemplo, el método de Soxhlet puede llevarse a cabo como a continuación usando éter de petróleo (punto de ebullición de 30-60°C). Se preparó harina de kril convencional tal como se describe en el documento US 2008/0274203 (Aker Biomarine ASA, Bruheim *et al.*) y se preparó el PPC con bajo contenido en fluoruro según la presente invención.

Los lípidos neutros son a menudo parte de agregados grandes en tejidos de almacenamiento, a partir de los cuales se extraen de manera relativamente fácil. Los lípidos polares, por otro lado, están presentes como constituyentes de membranas, en donde aparecen en asociación estrecha con proteínas y polisacáridos, con los cuales interaccionan, y por tanto no se extraen tan fácilmente. Además, los fosfolípidos están unidos de manera relativamente fuerte con proteínas hidrófobas y en particular con las proteínas fosforiladas.

Los datos muestran que la hidrólisis parcial de la matriz de proteína en la preparación de una composición de PPC con bajo contenido en fluoruro tal como se describe en el presente documento mejora la eficacia de extracción de lípidos totales mediante el uso de disolventes orgánicos apolares (por ejemplo, CO₂ supercrítico, etanol y/o éter de petróleo).

- 5 En resumen, se pesó una muestra de 10 g de o bien harina de kril triturada convencional o bien PPC con bajo contenido en fluoruro y se colocó en un aparato de Soxhlet y luego se extrajo de manera continua durante ocho (8) horas usando 300 ml de éter de petróleo. Tras la extracción, se evaporó el disolvente a 60°C bajo una corriente de nitrógeno. Soxhlet F., "Die gewichtsanalytische bestimmung des milchfettes" Dingler's Politech. J. 232:461-465 (1879).
- 10 Los resultados muestran que la proporción de lípidos residuales (por ejemplo, no extraídos) era dos veces más grande en la harina de kril convencional en comparación con la harina de kril con bajo contenido en fluoruro. Véase la tabla VI.

Tabla VI: Eficacia de extracción de lípidos de harinas de kril con bajo contenido en fluoruro

Material fuente	Lípidos de aceite de kril extraídos	Lípidos residuales del material fuente (por ejemplo, harina desaceitada)
Harina de kril convencional	79,6%	20,4%
Harina de kril con bajo contenido en fluoruro	88,9%	11,1%

- 15 En consecuencia, los métodos de extracción de lípidos descritos en el presente documento han proporcionado un resultado impredecible y sorprendente que proporciona un producto superior debido a una eficacia de extracción enormemente mejorada.

Ejemplo III

Determinación del contenido en fluoruro

- 20 Este ejemplo presenta un método de determinación del contenido en fluoruro de productos de kril como fluoruro mediante análisis químico usando un electrodo selectivo de iones.

Se preparó una harina de kril con PPC con bajo contenido en fluoruro tal como se describe en el presente documento y se extrajo según el ejemplo I para crear un aceite de kril con bajo contenido en fluoruro, y se analizó para determinar el contenido en fluoruro y se comparó con procesos de preparación convencionales. En resumen, el método dado a conocer en el presente documento elimina, en su mayor parte, el exoesqueleto de kril de la harina de kril reduciendo de ese modo el contenido en fluoruro. En cambio, el exoesqueleto de kril se incluye en la harina de kril convencional teniendo de ese modo niveles de fluoruro relativamente altos. Se describen procedimientos convencionales, por ejemplo, en el documento WO 2002/102394 (Neptune Technologies & Bioresources) y el documento US 2008/0274203 (Aker Biomarine ASA).

- 30 Las harinas de kril analizadas para determinar el contenido en fluoruro se produjeron mediante: i) un método de bajo contenido en fluoruro de la presente invención; y ii) un material de kril completo producido mediante un proceso convencional. Véase la tabla VII.

Tabla VII: Comparación del contenido en fluoruro con procesos convencionales

Material analizado	Preparación con bajo contenido en fluoruro	Preparación convencional
Harina de kril	200 - 500 ppm	1300 ppm
Aceite de kril	< 0,5 ppm	~ 3 - 5 ppm

- 35 Los datos demuestran que eliminando el exoesqueleto en el proceso de producción de harina de kril (por ejemplo, la preparación con bajo contenido en fluoruro tal como se da a conocer en el presente documento), el contenido en fluoruro de la harina de kril y el aceite de kril producido a partir de la harina tienen un contenido en fluoruro notablemente reducido (por ejemplo, reducción de 3 - 10 veces).

Ejemplo IV

Comparación del color del aceite de kril

- 40 El aceite de kril tiene normalmente un color rojo intenso que surge del carotenoide astaxantina presente en el aceite a niveles que varían desde 50 ppm hasta 1500 ppm. El color del aceite de kril puede determinarse con un espectrofotómetro LabScan® XE (Hunter Associates Laboratory, INC. Resbon, VA, EE.UU.) y notificarse en escalas de color CIELAB (valores L*, a* y b*). Puede producirse desviación del color rojo de la astaxantina cuando la biomasa de kril se procesa a alta temperatura y en condiciones que inducen oxidación. La desviación inducida por

oxidación típica en el color del aceite de kril es un aumento en el tono pardusco. El color marrón en el aceite de kril surge de la oxidación de lípidos y la formación de productos de oxidación secundaria y terciaria con residuos de amino. Este proceso se denomina también pardeamiento no enzimático.

5 Pirroles y productos de degradación de Strecker son productos del pardeamiento no enzimático que se han caracterizado en muestras de aceite de kril. Por ejemplo, la polimerización de pirroles da como resultado la formación de macromoléculas marrones, similares a melatonina. Además, el contenido en pirrol del aceite de kril puede determinarse espectroscópicamente con absorbancia a 570 nm.

10 Se examinarán muestras de tres aceites de kril para determinar el color. Una producida mediante el método de la presente invención, una producida a partir de kril congelado mediante un método descrito en el documento WO 2002/102394 (Neptune Technologies & Bioresources) y una extraída a partir de harina de kril secada con etanol solo tal como se describe en el documento US 2008/0274203 (Aker Biomarine ASA). Ha de hallarse que el aceite de kril producido mediante el método de la presente invención tiene el menor nivel de color marrón determinado espectrofotométricamente usando las escalas de color CIELAB (valores L*, a* y b*) y/o el menor nivel de pirroles determinado espectroscópicamente.

15 Ejemplo V

Determinación de la calidad organoléptica del aceite de kril

20 La calidad organoléptica del aceite de kril se determina convencionalmente mediante análisis químico de compuestos nitrogenados volátiles que surgen de la descomposición de proteínas de kril y óxido de trimetilamina (TMAO). Los compuestos nitrogenados analizados son nitrógeno volátil total (TVN) y trimetilamina (TMA). En términos simplificados, el nivel de compuestos nitrogenados se correlaciona con el nivel de deterioro de la materia prima, es decir la biomasa de kril usada para la extracción del aceite.

25 Se ha hecho evidente que, además de los compuestos nitrogenados volátiles, un gran número de componentes volátiles con olor distinto contribuyen a las propiedades sensoriales del aceite de kril. Muchos de los componentes volátiles surgen de la oxidación de compuestos lipídicos y proteicos de la biomasa de kril. Por tanto, un método que limite el nivel de degradación oxidativa en la biomasa de kril reducirá la cantidad de componentes volátiles en el aceite de kril.

30 La evaluación de la calidad organoléptica de diferentes tipos de aceite de kril la realizará un panel de individuos formados. Las propiedades sensoriales que van a determinarse incluyen varios parámetros predefinidos de olor y sabor. Debe hallarse que el aceite de kril novedoso tiene un perfil sensorial mejorado en comparación con los otros aceites sometidos a prueba. Los otros aceites que van a someterse a prueba incluyen uno extraído de kril congelado mediante un método descrito en el documento WO 2002/102394 (Neptune Technologies & Bioresources) y uno extraído de harina de kril secada con etanol solo tal como se describe en el documento US 2008/0274203 (Aker Biomarine ASA).

Ejemplo VI

35 Producción productos de crustáceos con bajo contenido en trimetilamina

40 Este ejemplo describe un método para producir productos de crustáceos con bajo contenido en TMA usando una composición de material de harina de kril. Un experto habitual en la técnica, tras la lectura de esta memoria descriptiva, entendería que esta composición de material de harina de kril puede tener un contenido en fluoruro variable, incluyendo contenidos en fluoruro por debajo de 0,5 ppm, además de los componentes básicos descritos a continuación. Véase la tabla VIII.

Tabla VIII: Composición de harina de kril no extraída

Ácido eicosapentaenoico (EPA)	11 g/100 g (11% p/p)
Ácido docosahexaenoico (DHA)	7 g/100 g (7% p/p)
Ácidos grasos omega-3	22,7 g/100 g (22,7% p/p)
Fosfolípidos (PL)	45 g/100 g (45% p/p)
Trimetilamina (TMA)	44 mg de N/100 g (0,044% p/p)
Óxido de trimetilamina (TMAO)	354 mg de N/100 g (0,354% p/p)

Puede prepararse entonces un aceite de kril a partir de la harina de kril usando extracción con etanol tal como se describió anteriormente que tiene los componentes básicos descritos a continuación. Véase la tabla IX.

Tabla IX. Componentes del aceite de kril tras la extracción con etanol convencional de harina de kril

Parámetro	Valor
EPA	11,5 g/100 g (11,5% p/p)
DHA	6,5 g/100 g (6,5% p/p)
Ácidos grasos omega-3	22,1 g/100 g (22,1% p/p)
Fosfolípidos	44 g/100 g (44% p/p)
Trimetilamina	50 mg de N/100 g (0,05% p/p)
Óxido de trimetilamina	216 mg de N/100 g (0,216% p/p)

Alternativamente, se preparó aceite de kril mediante extracción de harina de kril a 40 bar y 40°C usando dimetil éter supercrítico (DME SC). Se secó el extracto de DME en un instrumento Rotavapor® y luego se purgó con nitrógeno. Los componentes de la composición secada resultante se enumeran a continuación. Véase la tabla X.

5 Tabla X. Componentes del aceite de kril tras la extracción con DME SC de harina de kril

Parámetro	Valor
EPA	10,4 g/100 g (10,4% p/p)
DHA	6,8 g/100 g (6,8% p/p)
Ácidos grasos omega-3	21,7 g/100 g (21,7% p/p)
Fosfolípidos	45,7 g/100 g (45,7% p/p)
Trimetilamina	<1 mg de N/100 g (<0,001% p/p)
Óxido de trimetilamina	20 mg de N/100 g (0,02% p/p)

Estos datos muestran claramente que la extracción con DME supercrítico de composiciones de harina de kril da como resultado una reducción de 10 - 100 preferente de los niveles de TMA y TMAO.

Ejemplo VII

Perfiles de fosfolípidos por resonancia magnética nuclear de aceite de kril con bajo contenido en fluoruro

10 Este ejemplo presenta datos representativos de la composición de fosfolípidos de aceites de kril con bajo contenido en fluoruro preparados mediante los métodos descritos en el presente documento. Véase la tabla XI.

Tabla XI: Fosfolípidos en aceite de kril con bajo contenido en fluoruro analizado usando RMN de ³¹P.

Muestra n.º 1 (color; naranja)

Fosfolípido (PL)		% en peso de PL totales	g/100 g de muestra
Fosfatidilcolina	PC	79,7	31,1
Alquilacilfosfatidilcolina	AAPC	9,9	3,9
Fosfatidilinositol	PI	0,8	0,3
Fosfatidilserina	PS	0,7	0,3
Lisofosfatidilcolina	LPC	2,4	1,0
Lisoalquilacilfosfatidilcolina	LAAPC	0,6	0,2
Fosfatidiletanolamina	PE	3,5	1,4
Alquilacilfosfatidiletanolamina	AAPE	0,5	0,2
Cardiolipina + N-acilfosfatidiletanolamina	CL/NAPE	1,1	0,4
Lisofosfatidiletanolamina	LPE	0,6	0,2
Lisoalquilacilfosfatidiletanolamina	LAAPE	0,2	0,1

Contenido en fosfolípidos totales* 39,0 g/100 g de muestra

15 39,5 g/100 g de sólidos

n.d. = no detectado

* Suma de las clases de fosfolípidos identificadas

Muestra n.º 2 (color; naranja)

Fosfolípido (PL)		% en peso de PL totales	g/100 g de muestra
Fosfatidilcolina	PC	66,7	27,0
Alquilacilfosfatidilcolina	AAPC	6,9	2,8
Fosfatidilinositol	PI	0,9	0,4
Fosfatidilserina	PS		n.d.
Lisofosfatidilcolina	LPC	18,9	7,7

ES 2 666 048 T3

Lisoalquilacilfosfatidilcolina	LAAPC	0,8	0,3
Fosfatidiletanolamina	PE	1,4	0,6
Alquilacilfosfatidiletanolamina**	AAPE		
Cardiolipina + N-acilfosfatidiletanolamina	CL/NAPE	3,0	1,2
Lisofosfatidiletanolamina	LPE	1,2	0,5
Lisoalquilacilfosfatidiletanolamina	LAAPE	0,2	0,1
Contenido en fosfolípidos totales*		40,5 g/100 g de muestra	
		42,2 g/100 g de sólidos	

n.d. = no detectado

* Suma de las clases de fosfolípidos identificadas

5 Muestra n.º 3 (color; naranja)

Fosfolípido (PL)		% en peso de PL totales	g/100 g de muestra
Fosfatidilcolina	PC	72,3	31,1
Alquilacilfosfatidilcolina	AAPC	6,1	2,6
Fosfatidilinositol	PI	0,3	0,1
Fosfatidilserina	PS	0,2	0,1
Lisofosfatidilcolina	LPC	16,1	6,9
Lisoalquilacilfosfatidilcolina	LAAPC	0,8	0,3
Fosfatidiletanolamina	PE	1,8	0,8
Alquilacilfosfatidiletanolamina**	AAPE		
Cardiolipina + N-acilfosfatidiletanolamina	CL/NAPE	1,2	0,5
Lisofosfatidiletanolamina	LPE	1,1	0,5
Lisoalquilacilfosfatidiletanolamina	LAAPE		n.d.
Contenido en fosfolípidos totales*		43,0 g/100 g de muestra	
		45,1 g/100 g de sólidos	

n.d. = no detectado

* Suma de las clases de fosfolípidos identificadas

10 Muestra n.º 4 (color; naranja)

Fosfolípido (PL)		% en peso de PL totales	g/100 g de muestra
Fosfatidilcolina	PC	77,4	39,5
Alquilacilfosfatidilcolina	AAPC	8,9	4,6
Fosfatidilinositol	PI	0,9	0,5
Fosfatidilserina	PS	0,4	0,2
Lisofosfatidilcolina	LPC	5,5	2,8
Lisoalquilacilfosfatidilcolina	LAAPC	0,6	0,3
Fosfatidiletanolamina	PE	2,6	1,3
Alquilacilfosfatidiletanolamina**	AAPE	1,3	0,7
Cardiolipina + N-acilfosfatidiletanolamina	CL/NAPE	1,8	0,9
Lisofosfatidiletanolamina	LPE	0,5	0,3
Lisoalquilacilfosfatidiletanolamina	LAAPE	0,2	0,1
Contenido en fosfolípidos totales*		51,1 g/100 g de muestra	
		52,8 g/100 g de sólidos	

n.d. = no detectado

* Suma de las clases de fosfolípidos identificadas

15 ** Puede contener algo de glicerofosfocolina (GPC)

Muestra n.º 5 (color; naranja)

Fosfolípido (PL)		% en peso de PL totales	g/100 g de muestra
Fosfatidilcolina	PC	65,5	26,8
Alquilacilfosfatidilcolina	AAPC	9,4	3,9
Fosfatidilinositol	PI	1,6	0,6
Fosfatidilserina	PS	0,7	0,3
Lisofosfatidilcolina	LPC	10,1	4,2
Lisoalquilacilfosfatidilcolina	LAAPC	1,3	0,5
Fosfatidiletanolamina	PE	4,9	2,0
Alquilacilfosfatidiletanolamina	AAPE	2,1	0,9
Cardiolipina + N-acilfosfatidiletanolamina	CL/NAPE	2,8	1,2
Lisofosfatidiletanolamina	LPE	1,3	0,5
Lisoalquilacilfosfatidiletanolamina	LAAPE	0,3	0,1
Contenido en fosfolípidos totales*		41,0 g/100 g de muestra	43,0 g/100 g de sólidos

n.d. = no detectado

5 * Suma de las clases de fosfolípidos identificadas

Estos datos concuerdan con los obtenidos usando técnicas de cromatografía en columna convencionales mostradas en el ejemplo I.

Ejemplo VIII

Análisis de la composición de lípidos de material de PPC con bajo contenido en fluoruro

10 El ejemplo presenta datos que muestran el análisis de la composición de lípidos de una composición de complejo de fosfolípido-proteína con bajo contenido en fluoruro creada mediante los métodos descritos en el presente documento. En consecuencia, se esperaría que el contenido en fluoruro de las composiciones descritas a continuación fuera menor de 500 ppm.

15 El PPC comprende 46,7 g/100 g (por ejemplo, ~ 47%) de grasa total, 11,8 g/100 g (por ejemplo, ~ 12%) de ácido eicosapentaenoico (EPA) y 6,7 g/ 100 g (por ejemplo, ~7%) de ácido docosahexaenoico (DHA). El contenido en lípidos total de la grasa total de PPC fue del 87,7% (p/p) y comprende entre 115 - 260 mg/kg de astaxantina y entre el 35,2% - 46,7% de aceite no extraído.

Tabla XII: Grasa de PPC de kril con bajo contenido en fluoruro: Contenido en lípidos neutros (el 45,2% p/p de la grasa total): Número de muestra 1MG

Componentes	% (p/p) de lípidos neutros
Triacilglicerol	38
Diacilglicerol	1,7
Monoacilglicerol	< 1
Ácidos grasos libres	2,2
Colesterol	2,4
Ésteres de colesterol	< 0,5

20 Tabla XIII: Grasa de PPC de kril con bajo contenido en fluoruro: Contenido en lípidos neutros (el 46,6% p/p de la grasa total): Número de muestra 2MG

Componentes	% (p/p) de lípidos neutros
Triacilglicerol	41
Diacilglicerol	1,5
Monoacilglicerol	< 1
Ácidos grasos libres	1,6
Colesterol	1,8
Ésteres de colesterol	0,6

Tabla IXV: Lípidos neutros de PPC de kril con bajo contenido en fluoruro: Contenido en ácidos grasos (el 49,7% p/p de lípidos neutros): Número de muestra 1MG

Componentes	% (p/p) de lípidos neutros
Saturados	27,4
Monoenoicos	21,9
Poliinsaturados n-6	1,8
Poliinsaturados n-3	22,7
Total	74,4

Tabla XV: Lípidos neutros de PPC de kril con bajo contenido en fluoruro: Contenido en ácidos grasos (el 46,7% p/p de lípidos neutros): Número de muestra 2MG

Componentes	% (p/p) de lípidos neutros
Saturados	29,2
Monoenoicos	21,6
Poliinsaturados n-6	2,1
Poliinsaturados n-3	23,3
Total	76,9

- 5 Tabla XVI: Contenido en lípidos polares de PPC de kril con bajo contenido en fluoruro (el 42,6% p/p de lípidos totales): Número de muestra 1MG

Componentes	% (p/p) de lípidos polares
Fosfatidiletanolamina	3,4
Fosfatidilinositol	< 1
Fosfatidilserina	< 1
Fosfatidilcolina	37
Lisofosfatidilcolina	2,3

Tabla XVII: Contenido en lípidos polares de PPC de kril con bajo contenido en fluoruro (el 42,8% p/p de lípidos totales): Número de muestra 2MG

Componentes	% (p/p) de lípidos polares
Fosfatidiletanolamina	2,5
Fosfatidilinositol	< 1
Fosfatidilserina	< 1
Fosfatidilcolina	39
Lisofosfatidilcolina	1,8

Ejemplo IX

- 10 Análisis de la composición de lípidos de material de PPC desaceitado con bajo contenido en fluoruro

El ejemplo presenta datos que muestran el análisis de la composición de lípidos de una composición de complejo de fosfolípido-proteína desaceitada con bajo contenido en fluoruro creada mediante los métodos descritos en el presente documento. En consecuencia, se esperaría que el contenido en fluoruro de las composiciones descritas a continuación fuera menor de 500 ppm. El PPC desaceitado comprende 35 g/ 100 g (por ejemplo, ~ 35%) de grasa total, 16,6 g/100 g (por ejemplo, ~ 17%) de ácido eicosapentaenoico (EPA) y 10,0 g/ 100 g (por ejemplo, ~ 10%) de ácido docosahexaenoico (DHA). El contenido en lípidos total de la grasa total de PPC desaceitado fue del 87,7% (p/p) y comprende 115 mg/kg de astaxantina y el 35,2% de aceite no extraído.

- 15

Tabla XVIII: Grasa de PPC desaceitado de kril con bajo contenido en fluoruro: Contenido en lípidos neutros (el 20,1% p/p de grasa total): Número de muestra 3MG

Componentes	% (p/p) de lípidos neutros
Triacilglicerol	17
Diacilglicerol	0,6
Monoacilglicerol	< 1
Ácidos grasos libres	1,1
Colesterol	1,3
Ésteres de colesterol	< 0,5

Tabla IXX: Lípidos neutros de PPC desaceitado de kril con bajo contenido en fluoruro: Contenido en ácidos grasos (el 35,2% p/p de lípidos neutros): Número de muestra 3MG

Componentes	% (p/p) de lípidos neutros
Saturados	21,3
Monoenoicos	13,9
Poliinsaturados n-6	2,1
Poliinsaturados n-3	31,2

Tabla XX: Contenido en lípidos polares desaceitados de PPC de kril con bajo contenido en fluoruro (el 68,9% p/p de grasa total): Número de muestra 3MG

Componentes	% (p/p) de lípidos polares
Fosfatidiletanolamina	4,2
Fosfatidilinositol	< 1
Fosfatidilserina	< 1
Fosfatidilcolina	62
Lisofosfatidilcolina	2,2

Ejemplo X

Análisis de composición de mezclas de PPC/hidrolizado de proteína

- 5 El ejemplo presenta datos que muestran el análisis de la composición de lípidos de un complejo de fosfolípido-proteína con bajo contenido en fluoruro mezclada con una composición de hidrolizado de proteína creada mediante los métodos descritos en el presente documento en una razón aproximada de 60/40. Se esperaría que el contenido en fluoruro de las composiciones descritas a continuación fuera menor de 500 ppm. La mezcla comprende entre 28-30 g/100 g (por ejemplo, ~ 30%) de grasa total, 98 mg/kg de ésteres de astaxantina, menos de 1 mg/kg de astaxantina, un nivel de peróxido de menos del 0,1%;(mEq/kg) y/o un nivel de ananizada de menos del 0,1% (p/p).
- 10

Tabla XXI: Grasa de la mezcla de proteína/PPC con bajo contenido en fluoruro: Contenido en lípidos neutros (el 28% p/p de grasa total)

Componentes	% (p/p) de lípidos neutros
Triacilglicerol	34
Diacilglicerol	1,1
Monoacilglicerol	< 1
Ácidos grasos libres	1,0
Colesterol	1,9
Ésteres de colesterol	< 0,5

Tabla XXII: Lípidos neutros de la mezcla de proteína/PPC con bajo contenido en fluoruro: Contenido en ácidos grasos

Componentes	% (p/p) de lípidos neutros
Saturados	25,1
Monoenoicos	19,2
Poliinsaturados n-6	2,0
Poliinsaturados n-3	24,9

- 15 Tabla XXIII: Contenido en lípidos polares de la mezcla de proteína/PPC con bajo contenido en fluoruro

Componentes	% (p/p) de lípidos polares
Fosfatidiletanolamina	5,0
Fosfatidilinositol	< 1
Fosfatidilserina	< 1
Fosfatidilcolina	41
Lisofosfatidilcolina	1,4

REIVINDICACIONES

1. Composición de aceite de kril que comprende fosfolípidos y menos de 0,5 ppm de fluoruro y menos del 0,001% (p/p) de trimetilamina y menos del 0,02% (p/p) de óxido de trimetilamina y en donde dichos fosfolípidos son entre el 39-52% en peso.
- 5 2. Composición de aceite de kril según la reivindicación 1, en la que dichos fosfolípidos comprenden al menos el 65% de fosfatidilcolina, y al menos el 2,4 % (p/p) de lisofosfatidilcolina.
3. Composición de aceite de kril según una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 2, que comprende además triglicéridos, lípidos neutros, el 20-26% en peso de ácidos grasos omega-3 poliinsaturados, y al menos aproximadamente el 0,8% en peso de ácidos grasos libres.

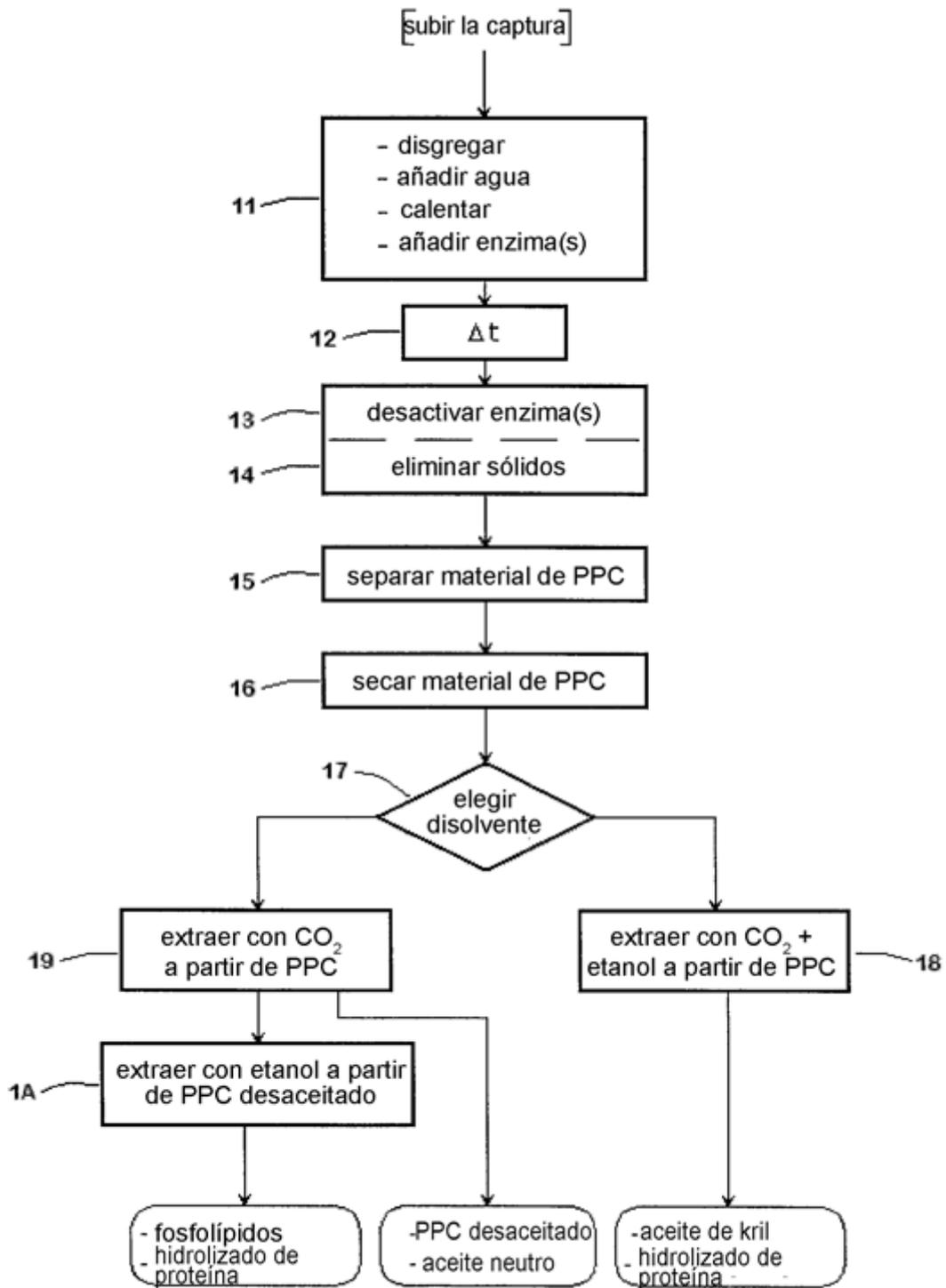


Fig. 1

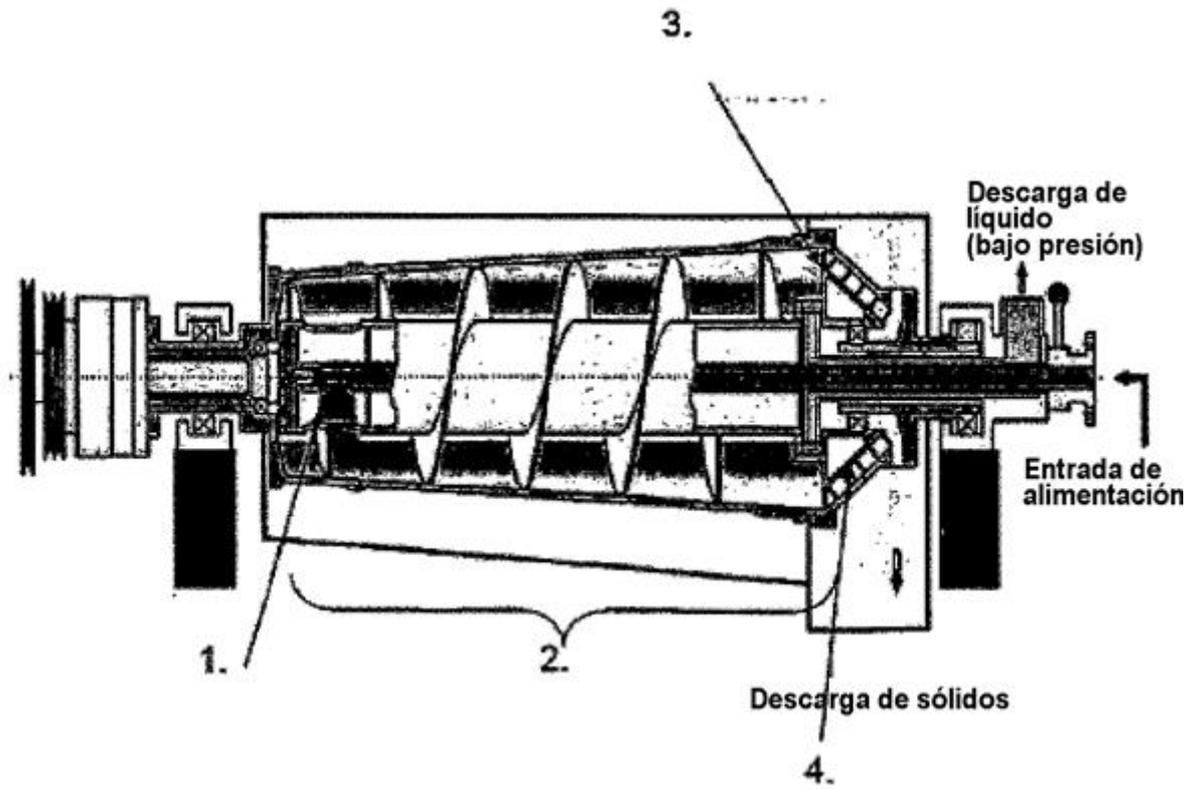


Fig. 2

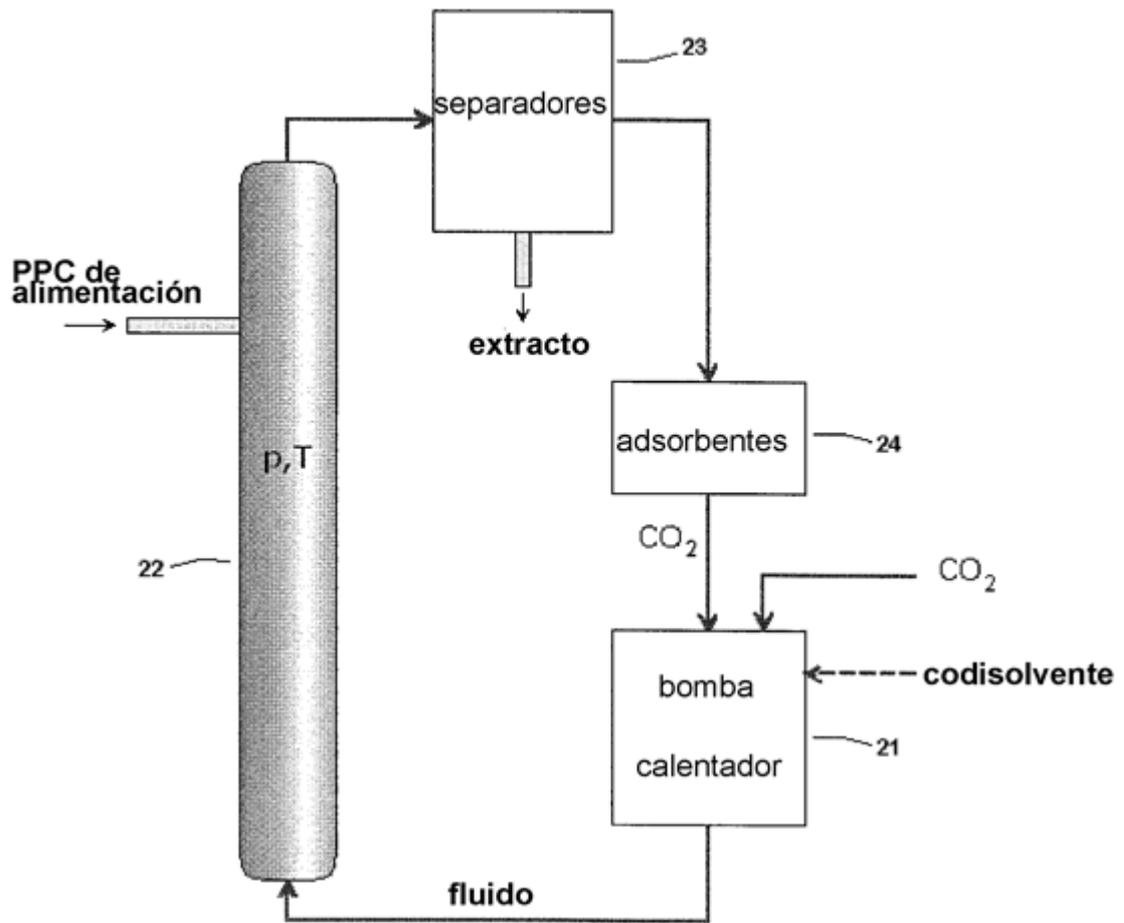


Fig. 3

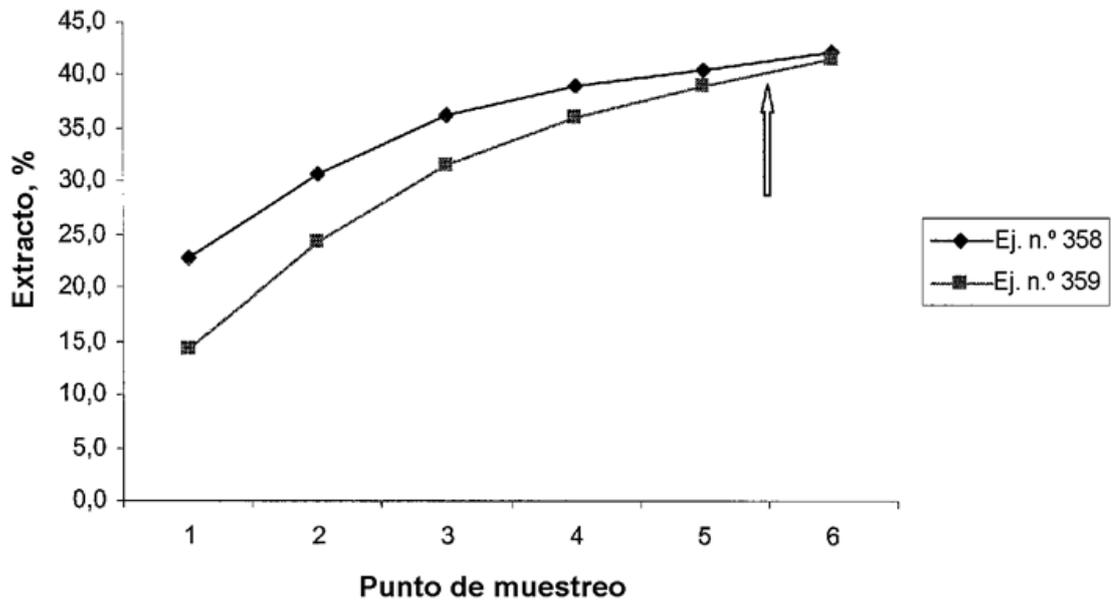


FIG. 4