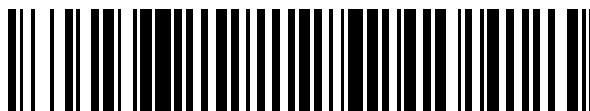


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 273**

51 Int. Cl.:

C11B 3/12 (2006.01)

C11B 7/00 (2006.01)

C11C 1/02 (2006.01)

C11C 3/00 (2006.01)

C11C 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2003 E 13153895 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018 EP 2602308**

54 Título: **Esterificación catalizada por lipasa de aceite marino**

30 Prioridad:

14.11.2002 NO 20025456

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

28.02.2019

73 Titular/es:

**PRNOVA BIOPHARMA NORGE AS (100.0%)
P.O. Box 420
1327 Lysaker, NO**

72 Inventor/es:

**HARALDSSON, GUDMUNDUR, G.;
HALLDORSSON, ARNAR y
THORSTAD, OLAV**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 702 273 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

Esterificación catalizada por lipasa de aceite marino

Es bien conocido en la técnica refinar productos oleaginosos de diversas clases, incluyendo aceites marinos, con la ayuda de catalizadores de lipasa cuya especificidad bajo las condiciones de refinado empleadas potencia la recuperación de un producto deseado.

La investigación extensiva se ha llevado a cabo para desarrollar procedimientos catalizados por lipasa para aislar dichos PUFA comercialmente importantes tales como EPA (ácido eicosapentanoico, C20:5) y DHA (ácido docosahexaenoico, C22:6) de composiciones tales como aceites de pescado que los contienen en concentraciones relativamente bajas.

Por ejemplo, en el documento PCT/NO95/00050 (WO 95/24459) los presentes inventores desvelaron un procedimiento para el tratamiento de una composición oleaginosa que contiene ácidos grasos saturados e insaturados en forma de triglicéridos a condiciones de reacción de transesterificación con un alcohol C₁₋₆ tales como etanol en condiciones sustancialmente anhidras en presencia de una lipasa activa para catalizar preferentemente la transesterificación de los ácidos grasos saturados y monoinsaturados. Con las lipasas preferidas, lipasa de *Pseudomonas sp.* (PSL, por sus siglas en inglés) y lipasa de *Pseudomonas fluorescens* (PFL, por sus siglas en inglés) fue posible preparar a partir de fuentes de aceite marino concentrados que contenían más del 70 % en peso de los ácidos grasos EPA y DHA omega-3 poliinsaturados comercial y terapéuticamente importantes en forma de glicéridos.

Un número de procedimientos de refinado catalizados por lipasas han utilizado glicerol.

A modo de ejemplo, pueden mencionarse los documentos JP 62-91188 (1987); WO91/16443; Int. J. Food Sci. Technol. (1992), 27, 73-76; Lie y Molin; Myrnes y col en JAOCS, Vol. 72, N.º 11 (1995), 1339-1344; Moore y col en JAOCS, Vol. 73, N.º 11 (1996), 1409-1414; McNeill y col en JAOCS, Vol. 73, N.º 11 (1996), 1403-1407; WO96/3758 y WO96/37587.

En el documento PCT/NO00/00056 (WO 00/49117) los presentes inventores proporcionaron un procedimiento para esterificar una composición de aceite marino que contenía EPA y DHA como ácidos grasos libres para formar una fracción de ácidos grasos libres enriquecida en al menos uno de estos ácidos grasos en comparación con la composición de partida, comprendiendo la etapa de hacer reaccionar dicha composición de aceite marino con glicerol en presencia de un catalizador de lipasa, la lipasa de *Rhizomucor miehei* (MML, por sus siglas en inglés), a presión reducida y condiciones esencialmente libres de disolvente orgánico y la recuperación de una fracción de ácidos grasos libres enriquecida en al menos uno de EPA y DHA. Preferentemente se usó destilación de corto recorrido para separar los ácidos grasos libres residuales de la mezcla de glicéridos.

Sin embargo, se ha vuelto ahora evidente que esta estrategia basada en destilación de corto recorrido para separar los ácidos grasos libres residuales de la mezcla de glicéridos no es muy factible.

Esto es un resultado de la volatilidad demasiado alta de los monoglicéridos de cadena más corta, que contaminan el destilado en un gran grado. Y. Shimada y col., JAOCS, Vol 74, n.º 2 (enero de 1997), pp. 97-101 describe la purificación de DHA por esterificación selectiva de ácidos grasos a partir de aceite de atún con lipasa de *Rhizopus delemar*.

El documento JP H10 176182 A desvela un procedimiento de refinado para ácidos grasos omega-3 altamente insaturados.

M. J. Hills y col., JAOCS, Vol 67, n.º 9 (septiembre de 1990), pp. 561-564 describe el fraccionamiento enzimático de ácidos grasos incluyendo el enriquecimiento de ácido γ -linolénico y DHA por esterificación selectiva catalizada por lipasas.

El documento WO 00/73254 y el documento JP H10 152693 desvelan procedimientos para la separación y la recuperación de ácidos grasos de cadena larga a partir de la transesterificación de aceite (tales como aceite de pescado).

Los presentes inventores han descubierto ahora que los procedimientos catalizados por lipasas para preparar concentrados de EPA y DHA por la esterificación directa de los ácidos grasos libres con metanol o etanol, o la transesterificación de ésteres de C_n alquilo a partir de aceite de pescado (n = 2 - 18) con alcohol C_m (alcoholólisis) (m = 1 - 12; n > m) y la posterior destilación de corto recorrido proporcionan altos concentrados de DHA. Estos procedimientos son rápidos y son reacciones sencillas que ofrecen excelente separación entre EPA y DHA sin generar monoglicéridos desfavorables en el destilado. Los rasgos esenciales de los procedimientos se definen en las reivindicaciones de patente adjuntas.

En la presente invención el alcohol C₁-C₁₂ es etanol (etanólisis).

Entre los ésteres de alquilo C₂-C₁₈, se usa el éster de hexilo.

En una primera realización, la invención se dirige hacia un procedimiento catalizado por lipasa para proporcionar

concentrados altos en ácido docosahexaenoico (DHA), que comprende las etapas:

- i) esterificación directa de ácidos grasos libres de ácido de pescado con etanol a 20-40 °C en presencia de la lipasa de *Rhizomucor miehei* (MML) inmovilizada sobre un vehículo;
- ii) separación de los ésteres de etilo enriquecidos en ácido eicosapentaenoico (EPA) de los ácidos grasos libres ricos en DHA por destilación de corto recorrido.

En otra realización, la invención se dirige hacia un procedimiento catalizado por lipasa para proporcionar concentrados altos en ácido docosahexaenoico (DHA), que comprende las etapas:

- i) tratamiento de ésteres de hexilo de aceite de pescado con etanol en presencia de una lipasa inmovilizada sobre un vehículo;
- ii) separación de los ésteres de etilo enriquecidos en ácido eicosapentaenoico (EPA) de los ácidos grasos libres ricos en DHA por destilación de corto recorrido.

La relación molar de metanol o etanol a ácidos grasos libres en el material de partida en la esterificación directa es de 0,5 a 10,0, la relación preferida es de 0,5 a 3,0 y la relación más preferida es de 1,0 a 2,0 o incluso de 1,0 a 1,5.

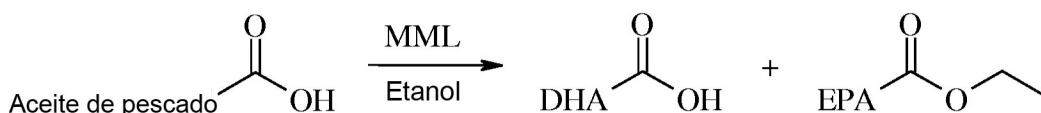
La relación molar de alcoholes C_m a ésteres de alquilo C_n en la transesterificación es de 0,5 a 10,0, la relación preferida es de 0,5 a 3,0 y la relación más preferida es de 2,0 a 3,0.

Las esterificaciones se llevan a cabo a una temperatura de 0 °C a 70 °C y preferentemente a una temperatura de 20 °C a 40 °C.

Los catalizadores de lipasa usados en la presente invención se inmovilizan sobre un vehículo.

Algunas lipasas usadas durante las alcoholisis tienen las propiedades de que catalizan la alcoholisis de DHA a una velocidad mucho más lenta que la alcoholisis correspondiente de EPA. Una lipasa preferida que tiene dichas propiedades es *Rhizomucor miehei* (MML). Otras lipasas tienen la propiedad de que catalizan la alcoholisis tanto de EPA como DHA a una velocidad mucho más lenta que la alcoholisis correspondiente de ácidos grasos de cadena más corta y más saturados. Las lipasas que tienen dichas propiedades son la lipasa de *Pseudomonas sp.* (PSL) y la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* (PFL).

La esterificación directa de los ácidos grasos libres del aceite de pescado con etanol por MML ya se conoce de G. G. Haraldsson y B. Kristinsson, J. Am. Oil Chem. Soc. 75: 1551-1556(1998).



Esquema 1. Esterificación directa de ácidos grasos libres del aceite de pescado con etanol por MML

Sin embargo, no se creyó que fuera posible una separación satisfactoria de los ácidos grasos libres residuales de DHA y los éteres de etilo por la técnica de destilación de corto recorrido. Ahora los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que la técnica de destilación de corto recorrido puede usarse de forma altamente satisfactoria. Esto es evidente a partir de los resultados mostrados en los ejemplos a continuación.

La presente invención desvela adicionalmente etanolisis de ésteres de hexilo de aceite de pescado mediante una lipasa y la posterior destilación molecular para separar ésteres de hexilo residuales y más ésteres de etilo volátiles.



Esquema 2. Etanolisis de ésteres de exilo del aceite de pescado por lipasa (MML).

Para mejorar además las recuperaciones de DHA y la concentración en el producto puede usarse una reacción de etanolisis como se describe en el documento PCT/NO95/00050 (WO 95/24459) como una pre-etapa antes de la esterificación directa.



Esquema 3. Etanólisis de aceite de pescado por lipasa (MML).

Antes de la esterificación directa la mezcla de glicéridos necesita hidrolizarse. Para reducir el volumen del material de partida a la mitad antes de la hidrólisis la reacción de etanólisis del documento PCT/NO95/00050 (WO 95/24459) se encuentra útil. La presente invención por lo tanto también desvela, como un procedimiento alternativo, una reacción de dos etapas enzimáticas empezando con una etanólisis y una posterior esterificación directa, cada etapa seguida de una concentración por destilación molecular. Esta reacción de dos etapas también es adecuada para aceites altamente enriquecidos con monoinsaturados de cadena larga, tales como aceite de arenque.

La reacción de dos etapas también es aplicable y ventajosa cuando los ésteres de hexilo del aceite de pescado son el material de partida.

La invención se ilustra por los Ejemplos que siguen.

Se han ensayado materiales de partida como aceite de sardina (AS), aceite de anchoa (AA), aceite de arenque (AAR), aceite de hígado de bacalao (AHB), aceite de atún (AAt) y aceite de merlán azul (AMA).

Procedimientos experimentales

Las lipasas bacterianas de *Pseudomonas* sp. (PSL; Lipasa AK) y *Pseudomonas fluorescens* (PFL; Lipasa PS) se obtuvieron de Amano Enzyme Inc. Las lipasas inmovilizadas *Rhizomucor miehei* (MML; Lipozima RM IM), *Thermomyces lanuginosa* (TLL; Lipozima TM IM) y *Candida antarctica* (CAL; Novozima 435) se proporcionaron por Novozyme en Dinamarca. El aceite de sardina (14 % de EPA y 15 % de DHA), el aceite de anchoa (18 % EPA y 12 % de DHA), el aceite de arenque (6 % de EPA y 8 % de DHA), el aceite de atún (6 % de EPA y 23 % de DHA), el aceite de hígado de bacalao (9 % de EPA y 9 % de DHA) y el aceite de merlán azul (11 % de EPA y 7 % de DHA) se proporcionaron todos por Pronova Biocare.

El análisis de ácidos grasos se realizó empleando un Cromatógrafo de Gases (CG) Perkin-Elmer 8140 equipado con un detector de ionización de llama (DIL). La columna capilar era una columna capilar de 30 metros DB-225 30 N, 0,25 μm de J&W Scientific. La destilación a corto plazo se llevó a cabo en un alambique Leybold KDL 4. Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se registraron en un espectrómetro Bruker AC 250 RMN en cloroformo deuterado como disolvente. La cromatografía preparativa en capa fina (TLC) se llevó a cabo en placas de gel de sílice de Merck (Art 5721). La elución se realizó con una mezcla 80:20:1 de éter de petróleo : éter dietílico : ácido acético. Se usó Rodamina G (Merck) para visualizar las bandas que posteriormente se rasparon y se metilaron. Se añadieron ésteres de metilo de $\text{C}_{19:0}$ (Sigma) a las muestras como patrones internos antes de la inyección a la CG.

Hidrólisis de aceite de pescado

El aceite de pescado (500 g, 0,55 mmol) se añadió a una solución de hidróxido sódico (190 g, 4,75 mol), agua (500 ml) y etanol al 96 % (1,7 l). La mezcla resultante se dejó a reflujo durante 30 minutos (hasta que se observó un líquido de color transparente) y después se enfrió a temperatura ambiente, agitando constantemente. Para neutralizar la solución, se añadió cuidadosamente ácido clorhídrico 6,0 M (870 ml, exceso del 10 %) y la mezcla resultante se transfirió a un embudo de separación. Los ácidos grasos libres se extrajeron dos veces con una mezcla 1:1 de éter de petróleo y éter dietílico (1,5 l). La capa orgánica se lavó después tres veces con agua (1,5 l) y se secó sobre sulfato magnésico anhidro. El agente de secado se filtró y los disolventes se retiraron por evaporación, terminando con evaporación en alto vacío durante 2 horas a 50 °C. El análisis en TLC analítica, una mancha única indicó ácidos grasos libres puros. El color del producto varió de un color amarillento a borgoña oscuro, dependiendo del aceite de pescado.

Esterificación directa de ácidos grasos del aceite de pescado con etanol

Se añadió MML inmovilizada (15 g) a una solución de ácidos grasos libres de aceite de pescado (300 g, aprox. 1,03 mol) y etanol absoluto (143 g, 3,10 mol). La suspensión enzimática resultante se agitó suavemente en nitrógeno a 40 °C hasta que se alcanzó la conversión deseada. Las muestras se tomaron durante la reacción y la cantidad residual de ácidos grasos libres se detectó por titulación con NaOH 0,02 M para monitorizar el progreso de la reacción. El fraccionamiento se realizó por TLC preparativa y cada fracción lipídica se cuantificó posteriormente y se analizó en el perfil de ácidos grasos por CG. Después de alcanzar la conversión deseada la enzima se retiró por filtración y el etanol en exceso se evaporó al vacío. El alto concentrado de DHA se obtuvo como residuo después de la destilación de corto recorrido de la mezcla resultante.

Etanólisis de aceite de pescado por lipasa

Se añadió MML inmovilizada (20 g) a una solución de aceite de pescado (400 g, 0,44 mol) y etanol absoluto (61 g, 1,32 mol). La suspensión enzimática resultante se agitó suavemente en nitrógeno a temperatura ambiente hasta que se alcanzó la conversión deseada. Después la enzima se retiró por filtración y el etanol en exceso se evaporó al vacío antes de la destilación de corto recorrido. El progreso de la reacción se monitorizó por TLC analítica y RMN ¹H. El fraccionamiento se realizó por TLC y cada fracción lipídica se cuantificó y se analizó en el perfil de ácidos grasos por CG.

Hexanólisis de aceite de pescado por lipasa

Se añadió CAL inmovilizada (25 g) a una solución de aceite de pescado (500 g, 0,55 mol) y 1-hexanol (338 g, 3,31 mol). La suspensión enzimática resultante se agitó suavemente en nitrógeno a 65 °C hasta que los triacilglicerol se hayan convertido completamente en ésteres de hexilo, de acuerdo con TLC analítica y/o RMN ¹H. La enzima se retiró por filtración y el hexanol en exceso se evaporó al vacío.

Etanólisis de ésteres de hexilo del aceite de pescado por lipasa

Se añadió MML inmovilizada (15 g) a una solución de ésteres de hexilo de aceite de pescado (300 g, 0,80 mol) y etanol absoluto (111 g, 2,41 mol). La suspensión enzimática resultante se agitó suavemente en nitrógeno a 40 °C hasta que se obtuvo la conversión deseada, de acuerdo con RMN ¹H. LA enzima se retiró por filtración y el etanol en exceso se evaporó al vacío. El concentrado alto en DHA se obtuvo como un residuo después de la destilación de corto recorrido en la mezcla resultante. La composición de ácidos grasos de cada grupo éster se determinó por una única ejecución en CG.

Ejemplo 1Esterificación Directa de los Ácidos Grasos Libres del Aceite de Pescado con EtanolAceite de sardina (AS)

El progreso de la reacción de esterificación directa de los ácidos grasos libres del AS, que contenía un 14 % de EPA y un 15 % de DHA (14/15), con 3 equivalentes de etanol en presencia de MML (5 % según se basa en el peso de los ácidos grasos) a 40 °C se muestra en la Tabla 1. En estas condiciones la lipasa mostró una actividad extremadamente alta hacia los ácidos grasos libres del AS. Se alcanzó más del 70 % de conversión (% de ésteres de etilo) después de solamente 2 horas. Después de 4 horas de reacción los ácidos grasos libres residuales contenían un 49 % de DHA y un 6 % de EPA en recuperaciones del 73 % y del 10 %, respectivamente. En términos de concentración y recuperaciones de DHA la conversión óptima parece ser alrededor del 75 % de conversión. En la Tabla 1 el porcentaje en peso de los ésteres de etilo producidos durante el progreso de la reacción se usó directamente como una medida del grado de conversión.

Tabla 1. El progreso de la reacción de esterificación directa de los ácidos grasos del AS (14/15) y etanol por MML a 40 °C

Tiempo	Conv. (% en mol)	Comp. AG (AGL)		Recuperación	
		% de DHA	% de EPA	% de DHA	% de EPA
1 h	60	32	20	84	56
2 h	71	43	11	80	21
3 h	74	46	7	78	13
4 h	77	49	6	73	10
5 h	78	49	5	69	8
7 h	80	50	5	65	7

Se obtuvieron resultados excelentes para la esterificación directa de los ácidos grasos libres del AS después de la separación por destilación de corto recorrido. Los ácidos grasos libres del AS se hicieron reaccionar con etanol en presencia de MML durante 4 horas a 40 °C para alcanzar el 78 % de conversión. Los ácidos grasos libres de la mezcla de reacción comprendían un 49 % de DHA y un 6 % de EPA con recuperaciones del 75 % de DHA. Después de la destilación a 115 °C el residuo comprendió un 69 % de DHA y un 9 % de EPA en recuperaciones del 65 % y del 10 %, respectivamente (Tabla 2). Las recuperaciones de DHA se mejoraron reduciendo ligeramente la temperatura de destilación (véase la Tabla 3). Los presentes inventores no fueron capaces de separar todos los ésteres de etilo de los ácidos grasos libres residuales por destilación. A pesar de eso, los presentes inventores trataron de obtener un alto concentrado de DHA de aproximadamente un 90 % de ácidos grasos libres y un 10 % de ésteres de etilo después de la destilación de corto recorrido a 115 °C. Los ésteres de etilo obtenidos en el residuo están altamente enriquecidos con DHA como los ácidos grasos libres. Adicionalmente, los ácidos grasos libres más

saturados y de cadena más corta se destilan dando como resultado una concentración de DHA más alta del residuo que para la fracción de ácidos grasos libres después de la reacción.

Tabla 2. Los resultados de la reacción de esterificación directa de los ácidos grasos del AS (14/15) y etanol por MML a 40 °C y separación por destilación a 115 °C.

Muestra	% en peso	Comp. de ácidos grasos		Recuperación	
		% de DHA	% de EPA	% de DHA	% de EPA
Éster etílico (EE)	78	4	19	25	95
Ácido graso libre (AGL)	22	49	6	75	5
Destilado (D) 115 °C	85	7	15	35	90
Residuo (R) 115 °C	15	69	9	65	10

Los resultados para el AS se mejoraron disminuyendo la temperatura de la conversión y de la destilación como se muestra en la Tabla 3. Después de 4 horas de reacción se obtuvo un 75 % de conversión. Después de la destilación a 111 °C el residuo contenía un 66 % de DHA en recuperaciones del 88 % con una relación DHA/EPA de 4,7. A una temperatura de destilación ligeramente más alta el residuo comprendió un 74 % de DHA en recuperaciones del 75 % con una relación DHA/EPA cercana a siete. Nótese que la recuperación de DHA después de las destilaciones se basa en el porcentaje en peso de DHA en el aceite de partida.

Tabla 3. Los resultados de la reacción de esterificación directa de los ácidos grasos del AS (14/15) y etanol por MML a 40 °C y separación por destilación a 111 y 113 °C.

Muestra	% en peso	Comp. de ácidos grasos		Recuperación	
		% de DHA	% de EPA	% de DHA	% de EPA
EE	75	3	17	23	87
AGL	25	47	7	77	13
D 111 °C	79	3	13	12	76
R 111 °C	21	66	14	88	24
D 113 °C	84	5	15	25	89
R 113 °C	16	74	11	75	11

El contenido de etanol puede reducirse a 1 equivalente dando como resultante un tiempo de reacción aumentado (Tabla 4). También puede introducirse menos lipasa dando como resultado una velocidad de reacción considerablemente menor.

Tabla 4. El progreso de la reacción de esterificación directa de los ácidos grasos del AS (14/15) y 1 equivalente de etanol por MML a 40 °C.

Tiempo	Conv. (% en mol)	Comp. de AG (AGL)		Recuperación	
		% de DHA	% de EPA	% de DHA	% de EPA
5 h	71	35	12	80	28
6 h	73	41	11	79	26
7 h	74	44	10	78	24
11 h	77	45	7	76	18

Aceite de anchoa (AA)

El progreso de la reacción de esterificación directa de los ácidos grasos libres del AA que comprende un 18 % de EPA y un 12 % de DHA (18/12) en condiciones idénticas al AS se muestra en la Tabla 5. Como puede observarse se obtuvo una relación DHA/EPA de aproximadamente 6:1 a una conversión del 82 % después de 24 horas comprendiendo EPA el 8 % y DHA el 50 %. La recuperación del DHA fue justo por debajo del 80 %. También después de 11 horas, al 79 % de conversión una relación DHA/EPA de 5:1 con recuperaciones de DHA tan altas como el 84 %. Por lo tanto, el AA y el AS son ambos materiales de partida altamente potenciales para fabricar concentrados altos en DHA y también, para fabricar concentrados altos en EPA a partir de la fracción de éster de

etilo que es de interés.

Tabla 5. El progreso de la reacción de esterificación directa de los ácidos grasos libres del AA (18/12) y etanol por MML a 40 °C.

Tiempo	Conv. (% en mol)	Comp. AG (AGL)		Recuperación	
		% de DHA	% de EPA	% de DHA	% de EPA
2 h	56	27	29	100	67
5 h	73	37	19	93	27
8 h	76	45	13	90	16
11 h	79	50	9	84	10
24 h	82	50	8	78	8

Los resultados para el AA son buenos en términos de concentración de DHA y relaciones DHA/EPA como se muestra en la Tabla 6. Los ácidos grasos libres del AA (19/12) se hicieron reaccionar antes de alcanzar el 76 % de la conversión en 11 horas. Después de la destilación a 121 °C el residuo comprendió un 61 % de DHA solamente en un 64 % de la recuperación siendo la relación DHA/EPA 5,5. El destilado puede usarse posiblemente para fabricar concentrados altos en EPA mediante una destilación repetida a menor temperatura. Como un ejemplo un concentrado del 45 % de EPA y un 10 % de DHA se considera ser una composición deseable para un potencial producto comercial.

Tabla 6. Los resultados de la reacción de esterificación directa de los ácidos grasos libres del AA (19/12) y etanol por MML a 40 °C y separación por destilación a 121 °C.

Muestra	% en peso	Comp. ácidos grasos		Recuperación	
		% de DHA	% de EPA	% de DHA	% de EPA
EE	76	2	21	10	84
AGL	24	45	13	90	16
D 121 °C	87	5	20	36	93
R 121 °C	13	61	11	64	7

Aceite de Arenque (AAR)

Los ácidos grasos libres del aceite de arenque que comprenden un 6 % de EPA y un 8 % de DHA (6/8) se trataron similarmente bajo las condiciones de esterificación directa como se describen anteriormente. El progreso de la reacción se muestra en la Tabla 7. Los ácidos grasos libres residuales después de 12 horas contenían un 37 % de DHA y un 6 % de EPA con recuperaciones del 90 % y del 18 %, respectivamente.

Tabla 7. El progreso de la reacción de esterificación directa de los ácidos grasos libres del AAR (6/8) y etanol por MML a 40 °C.

Tiempo	Conv. (% en mol)	Comp. AG (AGL)		Recuperación	
		% de DHA	% de EPA	% de DHA	% de EPA
4 h	62	20	12	97	71
6 h	70	24	12	96	61
8 h	74	26	11	96	52
12 h	80	37	6	90	18
24 h	82	37	7	84	10

Los ácidos grasos libres de diferentes AAR que comprenden un 9 % de EPA y un 9 % de DHA (9/9) se hicieron reaccionar durante 12 horas, para alcanzar un 84 % de la conversión, de la misma manera que antes. Los ácidos grasos libres de la mezcla de reacción comprendieron un 39 % de DHA y un 8 % de EPA con una recuperación de DHA del 76 %. Después de la destilación a 110 °C el residuo contuvo un 40 % de DHA y un 7 % de EPA en una recuperación del 68 % de DHA con una relación DHA/EPA de casi 6:1 (Tabla 8). La baja concentración de DHA resulta de altos contenidos de ácidos grasos monoinsaturados de cadena larga de 20:1 (4 %) y 22:1 (37 %). Este alto contenido de ácidos grasos monoinsaturados de cadena larga en el AAR y en el aceite de capelán los hace un material de partida menos factible para el procedimiento descrito. Una sencilla inclusión de urea del aceite residual

puede usarse para retirar la mayoría de estos ácidos grasos monoinsaturados dando como resultado un concentrado valioso de DHA. Debe añadirse que el Aar con su bajo contenido en EPA es más adecuado para obtener altas relaciones DHA/EPA que el AS y el AA.

Tabla 8. Los resultados de la reacción de esterificación directa de los ácidos grasos libres del AAr (9/9) y etanol por MML a 40 °C y separación por destilación a 110 °C.

Muestra	% en peso	Comp. ácidos grasos		Recuperación	
		% de DHA	% de EPA	% de DHA	% de EPA
EE	84	2	8	34	76
AGL	16	31	13	66	24
D 110 °C	82	4	10	32	88
R 110 °C	18	40	7	68	12

Aceite de Atún (AAt)

El progreso de la reacción de esterificación directa de los ácidos grasos libres del AAt que comprende un 6 % de EPA y un 23 % de DHA (6/23) en condiciones idénticas al AS descritas anteriormente se muestra en la Tabla 9 a continuación. Después de 8 horas de reacción se obtuvo una conversión del 68 % con los ácidos grasos libres residuales que comprendían un 74 % de DHA y un 3 % de EPA con una recuperación del 83 % de DHA y una relación DHA/EPA de 25:1 (Tabla 9). Claramente, este tipo de composición inicial EPA/DHA del aceite de partida es ideal para concentrar DHA.

Tabla 9. El progreso de la reacción de esterificación directa de los ácidos grasos libres del AAt (6/23) y etanol por MML a 40 °C.

Tiempo	Conv. (% en mol)	Comp. AG (AGL)		Recuperación	
		% de DHA	% de EPA	% de DHA	% de EPA
1 h	43	47	9	98	78
2 h	52	69	9	97	65
3 h	62	68	9	96	50
5 h	65	70	6	92	47
8 h	68	74	3	83	14
11h	70	77	2	78	11
24 h	73	74	2	71	8

Aceite de hígado de bacalao (AHB)

El progreso de la reacción de esterificación directa de los ácidos grasos libres del AHB que comprende un 9 % de EPA y un 9 % de DHA (9/9) en condiciones similares a las descritas anteriormente se muestra en la Tabla 10. Se obtuvo alrededor de una conversión del 79 % y una relación DHA/EPA de 5:1 para los ácidos grasos libres residuales con un 50 % de concentración de DHA y más del 80 % de recuperación. Estos resultados son incluso mejores que aquellos para el AS y el AA considerando las recuperaciones de DHA potenciales. Pero en términos de coste, el AS y el AA se favorecen por encima del AHB. Puede ser de interés comparar los resultados del AHB (9/9) con aquellos del AAr (9/9) a la luz del hecho de que el AHB contiene muchos menos monoinsaturados de cadena larga (20:1 y 22:1).

Tabla 10. El progreso de la reacción de esterificación directa de los ácidos grasos libres del AHB (9/9) y etanol por MML a 40 °C.

Tiempo	Conv. (% en mol)	Comp. AG (AGL)		Recuperación	
		% de DHA	% de EPA	% de DHA	% de EPA
2 h	65	37	20	96	62
3 h	71	42	17	94	43
5 h	75	46	13	91	27
8 h	79	48	10	86	17
11 h	80	50	7	76	12
24 h	82	53	5	76	8

Aceite de merlán azul (AMA)

El progreso de la reacción de esterificación directa de los ácidos grasos libres del AMA que comprende un 11 % de EPA y un 7 % de DHA (11/7) en condiciones similares a las descritas anteriormente se muestra en la Tabla 11. Alrededor de una conversión del 73 % los ácidos grasos libres residuales comprendían un 24 % de DHA en recuperaciones del 95 %. El EPA no se transfirió a los ésteres de etilo tan rápidamente como se esperaba. De forma interesante y a diferencia del AAr, los ácidos grasos libres monoinsaturados de cadena larga se convirtieron en un grado mucho mayor a ésteres de etilo. La conversión más alta es necesaria para obtener mejor separación de EPA y DHA. La razón para la baja conversión de AMA no está clara, pero varios intentos no dieron como resultado una conversión más alta.

Tabla 11. El progreso de la reacción de esterificación directa de los ácidos grasos libres del AMA (11/7) y etanol por MML a 40 °C.

Tiempo	Conv. (% en mol)	Comp. AG (AGL)		Recuperación	
		% de DHA	% de EPA	% de DHA	% de EPA
4 h	70	22	23	95	51
7 h	71	23	23	95	50
9 h	72	23	23	95	49
24 h	73	24	21	95	44

Ejemplo 2Etanolisis Combinada y Esterificación Directa de Aceite de Pescado

- Una reacción de dos etapas, empezando con una etanolisis y una posterior esterificación directa, cada etapa seguida de destilación molecular, podría usarse para mejorar las recuperaciones de DHA y la concentración en el producto. Antes de la esterificación directa la mezcla de glicéridos obtenida de la etanolisis necesita hidrolizarse. Por lo tanto, la reacción de etanolisis puede usarse como una pre-etapa, reduciendo el volumen del material de partida a la mitad antes de la hidrólisis. Nótese las altas recuperaciones obtenidas en la etanolisis a 40 °C después de la separación por destilación (Tabla 12). Se obtuvieron mejores resultados a temperatura ambiente como se analiza anteriormente y se muestra en las Tablas 13 y 14. El residuo de la reacción de temperatura ambiente comprendió un 23 % de DHA y un 25 % de EPA en las recuperaciones del 97 % y del 65 %, respectivamente (Tabla 13). Estos resultados indican que las recuperaciones de DHA pueden mejorarse significativamente por el procedimiento de dos etapas. También, hay una reducción drástica en la voluminosidad para la reacción de hidrólisis. Finalmente, este enfoque puede ser adecuado para los aceites altamente enriquecidos con monoinsaturados de cadena larga, tales como el AAr.

Tabla 12. Los resultados de la etanolisis combinada y la esterificación directa del AA. Etanolisis del AA (19/12) con etanol por MML a 40 °C y la separación por destilación a 125 °C, seguido de esterificación directa de los ácidos grasos libres resultantes con etanol por MML y separación por destilación a 115 °C.

Muestra	% en peso	Comp. ácidos grasos		Recuperación	
		% de DHA	% de EPA	% de DHA	% de EPA
D 125 °C	41	1	14	3	27
R 125 °C	59	18	24	97	73
D 115 °C	66	4	22	12	69
R 115 °C	34	54	22	88	31

Tabla 13. Los resultados de la reacción de etanolisis del AA (18/12) y etanol por MML a temperatura ambiente y la separación por destilación a 125 °C.

Muestra	% en peso	Comp. ácidos grasos		Recuperación	
		% de DHA	% de EPA	% de DHA	% de EPA
D 125 °C	47	2	15	3	35
R 125 °C	53	23	25	97	65

Tabla 14. Los resultados de la reacción de etanolisis del AA (18/12) y etanol por MML a 40 °C ambiente y la separación por destilación a 125 °C.

Muestra	% en peso	Comp. ácidos grasos		Recuperación	
		% de DHA	% de EPA	% de DHA	% de EPA
D 125 °C	41	1	14	3	27
R 125 °C	59	18	24	97	73

Ejemplo 3Etanolisis de Ésteres de Hexilo de Aceite de Pescado

La etanolisis de los ésteres de hexilo (EH) a partir de aceite de pescado es una alternativa a la etanolisis previamente descrita de triglicéridos de aceite de pescado (Esquema 2). Los resultados indican que diversas lipasas incluyendo la lipasa de *Rhizomucor miehei* (MML) y las lipasas de *Pseudomonas* (PSL y PFL) pueden usarse así como la recientemente comercializada lipasa de *Thermomyces lanuginosa* (TLL) de Novozyme. También, se ha confirmado que la destilación molecular es bastante adecuada para separar ésteres de hexilo residuales y los ésteres de etilo más volátiles.

La lipasa de *Candida antarctica* (CAL) se usó para convertir los triglicéridos del AA en los correspondientes ésteres de hexilo en un tratamiento con hexanol. El tratamiento de los ésteres de hexilo resultantes con etanol y PSL seguido de la destilación molecular de la mezcla de reacción puede proporcionar ésteres de hexilo residuales con aproximadamente un 80 % de EPA y DHA en una única o en dos etapas enzimáticas. Concentrando el DHA en los ésteres de hexilo no solamente pueden separarse los ésteres de etilo de los ésteres de hexilo sino también destilarse igualmente los ésteres de hexilo más saturados. Puede ser posible convertir los ésteres de hexilo en ésteres de etilo bien química o enzimáticamente usando CAL. Alternativamente, es posible tratar los ésteres de hexilo del aceite de anchoa en etanolisis usando MML que puede proporcionar aproximadamente un 70 % de DHA en una etapa enzimática única como ésteres de hexilo. Pueden concentrarse adicionalmente mediante un tratamiento adicional de MML. A partir del granel de los ésteres de etilo que contienen la mayoría del EPA puede ser posible purificar el EPA hasta los niveles de un ≥ 95 %.

Un enfoque alternativo de dos etapas se basa en la etanolisis de aceite de sardina para producir un concentrado del 50 % de EPA + DHA (30/20) como una mezcla de glicéridos después de la destilación molecular. El tratamiento de los glicéridos residuales con hexanol y CAL proporciona ésteres de hexilo de composición idéntica. Pueden tratarse bien con etanol y PSL para proporcionar ésteres de hexilo con aproximadamente un 80 % de EPA y DHA, o bien con etanol y MML para separar el DHA del EPA, seguido de una concentración adicional tanto de EPA como de DHA. Este procedimiento puede tener ventaja en que el volumen del aceite de pescado se está tratando con etanol en lugar de hexanol, que es más fácil, menos voluminoso y más factible desde el punto de vista industrial. También debe tenerse en mente que puede esperarse una recuperación muy alta a excelente tanto de EPA como de DHA por ese procedimiento.

Aceite de anchoa (AA)

Igual que para la etanolisis de los triglicéridos del aceite de pescado la selectividad de los ácidos grasos y la actividad de la MML pueden afectarse gravemente por la temperatura. De esta manera, la MML puede usarse para concentrar tanto EPA como DHA a o por debajo de 20 °C, pero a 40 °C se separa el EPA del DHA dando como resultado altos concentrados de DHA. Los ésteres de hexilo del aceite de anchoa que comprenden un 18 % de EPA y un 12 % de DHA se hicieron reaccionar con 2 equivalentes de etanol en presencia de MML (10 % en peso de los ésteres de hexilo) durante 24 horas a 40 °C para alcanzar un 59 % de conversión. Después de la retirada de la lipasa el exceso de etanol se retiró y la mezcla de éster de etilo/éster de hexilo (EE/EH) se destiló a 135 °C a 0,3 Pa. El residuo (26 % en peso) comprendió un 43 % de DHA solamente en la recuperación del 65 %. La relación DHA/EPA fue solamente 2,2 (Tabla 15).

Tabla 15. Los resultados de la etanolisis de los ésteres de hexilo del AA (18/12) y etanol por MML a 40 °C y separación por destilación molecular a 135 °C.

Muestra	% en peso ^a	Comp. AG (EH)		Recuperación	
		% de DHA	% de EPA	% de DHA	% de EPA
EE	59	6	18	30	62
HE	41	21	13	70	38
R135°C	26	43	20	65	28

^a En las Tablas 15 y 16 la conversión de las reacciones catalizadas por lipasa se basa en porcentaje en moles, mientras que los resultados de destilación se basan en peso.

Se obtuvieron resultados interesantes cuando la temperatura de reacción se disminuyó a 20 °C en una reacción similar de ésteres de hexilo del aceite de anchoa (18/13). Después de la destilación a 135 °C el residuo comprendió un 45 % de DHA y un 30 % de EPA con recuperaciones del 85 % y del 55 %, respectivamente (Tabla 16).

Tabla 16. Los resultados de la etanolisis de los ésteres de hexilo del AA y etanol por MML a 20 °C y separación por destilación molecular a 135 °C.

Muestra	% en peso	Comp. AG (EH)		Recuperación	
		% de DHA	% de EPA	% de DHA	% de EPA
EE	50	1	9	4	26
EH	50	23	25	96	74
R 135 °C	32	45	30	87	53

Las lipasas de *Pseudomonas* se ensayaron a una pequeña escala con buenos resultados, dando alta recuperación de EPA pero una recuperación de DHA considerablemente menor, especialmente si la reacción excedía el 50 % de conversión. Los resultados de la reacción de etanolisis del AA (18//12) con 2 equivalentes de etanol en presencia de PSL y PFL a temperatura ambiente se muestran en la Tabla 17. Para PFL. Solamente después del 44 % de conversión de ésteres de hexilo del aceite de sardina en 24 horas, se obtuvo el contenido del 28 % de EPA y el 21 % de DHA mientras que el 57 % de conversión para PSL en 24 horas rindió un 33 % de EPA y un 17 % de DHA.

Tabla 17. Los resultados de la reacción de etanolisis de los ésteres de hexilo del AA (18/12) y etanol por PFL y PSL a temperatura ambiente.

Tiempo	Conv. (% en mol)	Comp. AG (EH)		Recuperación	
		% de DHA	% de EPA	% de DHA	% de EPA
PFL	44	21	28	81	89
PSL	57	17	33	53	79

La nueva lipasa de Novozyme (TLL), inmovilizada en gel de sílice granular, se comparó con MML. La nueva lipasa se descubrió ser sensible a etanol y la actividad disminuyó rápidamente con temperatura aumentada. A 20 °C ambas lipasas eran activas y en 24 horas se obtuvo un 54 % de conversión para MML pero solamente un 43 % para TLL. Los ésteres de hexilo residuales del AAt, que comprendían un 6 % de EPA y un 28 % de DHA (6/28), de la reacción de TLL contenían un 8 % de EPA y un 45 % de DHA. La reacción de MML dio como resultado ésteres de hexilo residuales que contenían un 7 % de EPA y un 54 % de DHA (Tabla 18). Estas lipasas son obviamente similares en selectividad por ácidos grasos pero la TLL es más sensible hacia la concentración de etanol, lo que la hace inferior a la MML.

Tabla 18. Los resultados de la reacción de etanolisis de los ésteres de hexilo del AAt (6/28) y etanol por MML y TLL a temperatura ambiente.

Muestra	Conv. (% en mol)	Comp. AG (EH)		Recuperación	
		% de DHA	% de EPA	% de DHA	% de EPA
MML	54	54	7	89	54
TLL	42	45	8	93	77

Los resultados de la etanolisis de los ésteres de hexilo del AAt (6/28) y etanol a 40 °C se muestran en la Tabla 19. De forma interesante, a 40 °C solamente se obtuvo un 15 % de conversión para TLL y un 47 % de conversión para MML. Se cree que a una temperatura más alta la lipasa se vuelve más sensible por el etanol polar y sus efectos perjudiciales. Para la MML, después de un 47 % de conversión en 24 horas, los ésteres de hexilo comprendían un 9 % de EPA y un 49 % de DHA mientras que solamente el 15 % de conversión para TLL en 24 horas rindió un 33 % de EPA y un 17 % de DHA.

Tabla 19. Los resultados de la reacción de etanolisis de los ésteres de hexilo del AAt (6/28) y etanol por MML y TLL a 40 °C.

Muestra	Conv. (% en mol)	% de DHA		% de EPA	
		% de DHA	% de EPA	% de DHA	% de EPA
MML	47	49	9	93	79
TLL	15	30	7	97	95

Por la presente invención se obtiene exitosamente la separación de EPA y DHA por esterificación directa libre de disolvente de los ácidos grasos libres del aceite de pescado o de los ésteres de hexilo del aceite de pescado en presencia de una lipasa. Los problemas con los monoglicéridos en el destilado se evitan mediante los procedimientos de acuerdo con la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento catalizado por lipasa para proporcionar concentrados altos en ácido docosahexaenoico (DHA), que comprende las etapas:
 - 5 i) esterificación directa de ácidos grasos libres de aceite de pescado con etanol a 20-40 °C en presencia de la lipasa de *Rhizomucor miehei* (MML) inmovilizada sobre un vehículo;
 - ii) separación de los ésteres de etilo enriquecidos en ácido eicosapentaenoico (EPA) de los ácidos grasos libres ricos en DHA por destilación de corto recorrido.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además las etapas:
 - 10 a) etanolólisis del aceite de pescado mediante la lipasa de *Rhizomucor miehei* (MML) inmovilizada sobre un vehículo;
 - b) destilación de corto recorrido; y
 - c) hidrólisis de la mezcla de glicéridos residual;
 en el que las etapas a), b) y c) se llevan a cabo antes de la etapa i).
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la relación molar de etanol a ácidos grasos libres en la composición de partida de la etapa i) es de 0,5 a 3,0.
4. Un procedimiento catalizado por lipasa para proporcionar concentrados altos en ácido docosahexaenoico (DHA), que comprende las etapas:
 - 20 i) tratamiento de ésteres de hexilo de aceite de pescado con etanol en presencia de una lipasa inmovilizada sobre un vehículo;
 - ii) separación de los ésteres de etilo enriquecidos en ácido eicosapentaenoico (EPA) de los ésteres de hexilo ricos en DHA por destilación de corto recorrido.
5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicha lipasa se selecciona de la lipasa de *Rhizomucor miehei* (MML), la lipasa de *Pseudomonas sp.* (PSL), la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* (PFL) o la lipasa de *Thermomyces lanuginosa* (TLL).
- 25 6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el aceite de pescado es aceite de anchoa, la lipasa es MML y en el que la etapa i) se lleva a cabo a 40 °C.