

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 120 898**

② Número de solicitud: 9602090

⑤ Int. Cl.⁶: C07C 57/03
C12N 1/12

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **04.10.96**④ Fecha de publicación de la solicitud: **01.11.98**Fecha de concesión: **12.04.99**④ Fecha de anuncio de la concesión: **16.05.99**④ Fecha de publicación del folleto de patente:
16.05.99⑦ Titular/es: **Universidad de Almería
Ctra. de Sacramento, s/n
04120 Almería, ES**⑦ Inventor/es: **Molina Grima, Emilio;
Robles Medina, Alfonso;
Giménez Giménez, Antonio y
Ibáñez González, M^a. José**⑦ Agente: **Fernández Marquina, Pilar**⑤ Título: **Obtención de ácido eicosapentaenoico de alta pureza a partir de la microalga
Phaeodactylum tricornerutum mediante un proceso de tres etapas.**

⑤ Resumen:

El ácido eicosapentaenoico (EPA), de alto interés para la salud humana, ha sido obtenido de la microalga *Phaeodactylum tricornerutum* mediante un proceso de tres etapas: extracción de los ácidos grasos por saponificación directa de la biomasa húmeda; concentración de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) por el método de la urea y purificación del EPA por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La extracción de los ácidos grasos se ha llevado a cabo con KOH-etanol (96% v/v) (1h, 60°C) extrayéndose el 90,9% del EPA presente en la biomasa. La relación urea/ácidos grasos ha sido 4:1 p/p, la temperatura de cristalización 28°C y se ha utilizado metanol como disolvente de la urea, obteniéndose un rendimiento del 78,6% en EPA. La purificación del EPA se ha realizado en una columna de 4,7 cm d.i. × 30 cm, fase inversa C₁₈ y utilizando metanol-agua (1% ACh) 80:20 p:p como fase móvil; el 97,3% del EPA cargado en la columna se ha recuperado con una pureza del 95,8%. El rendimiento global del proceso es del 69,5%. La producción de EPA de alta pureza es de 2,46 g/día, determinada por la producción de biomasa de *Phaeodactylum tricornerutum* de un fotobiorreactor tubular externo (100g/día): Este mismo proceso puede aplicarse a otras microalgas y a la obtención de otros PUFAs.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

Obtención de ácido eicosapentaenoico de alta pureza a partir de la microalga *Phaeodactylum tricor-
nutum* mediante un proceso de tres etapas.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a la obtención de ácido eicosapentaenoico (EPA) de alta pureza procedente
de la microalga *Phaeodactylum tricor-
nutum* mediante un proceso de tres etapas: extracción de los ácidos grasos poliinsatura-
dos (PUFAs) por el método de la urea y purificación del EPA por HPLC (Cromatografía líquida de alta
resolución)

Antecedentes de la invención

15 El ácido Eicosapentaenoico (EPA) tiene interés debido a su importante papel en la salud humana.
El EPA tiene usos potenciales en la prevención y tratamiento de trastornos del corazón y enfermedades
cardiovasculares (Dyerberg J, Linoleate-Derived Polyunsaturated Fatty Acids and Prevention of Athe-
rosclerosis. Nutr. Rev, 1986, 44:125-134) (Simopoulos AP, Am. J. Clin. Nutr, 1991, 54:438-463),
20 inflamaciones (Ziboh VA, w3 Polyunsaturated Fatty Acid Constituents of Fish Oil and the Management
of skin inflammatory and scaly disorders. In Simopoulos AP, Kifer RR Martin RE and Barlow SM (eds),
Health Effects of w3 Polyunsaturated Fatty Acid in Seafoods. Word Rev. Nutr. Diet, 1991, 66:425-435) y
cáncer (Braden LM and Carroll KK Dietary Polyunsaturated Fat in relation to Mammary Carcinogenesis
in Rats.Lipids, 1986, 21:285-288).

25 Estas aplicaciones farmacológicas y clínicas requieren EPA de altas concentraciones. La no dispo-
nibilidad de EPA (así como otros ácidos grasos poliinsaturados, PUFAs) con una pureza elevada y en
cantidades adecuadas, retrasa seriamente la investigación sistemática de los papeles preventivos y te-
rapéuticos del ácido Eicosapentaenoico (Yongmanitchai W and Ward OP, w3 Fatty Acids, Alternative
Sources of Production, Process Biochem, 1989, August:117-125). Por tanto, se necesitan métodos rápidos
30 y fidedignos de extracción y purificación de los PUFAs.

Se ha descubierto que muchas especies de microalgas son ricas en aceites, conteniendo cantidades
variables de PUFAs. Su comercialización depende de su competitividad con los aceites de pescado. Pero
35 dado que los aceites de pescado contienen una mezcla de muchos ácidos grasos metabólicamente acti-
vos se necesitan aceites que contengan un único ácido graso bioactivo en concentraciones altas (Kyle
D Am. Oil Chem. Soc, 1989, 66:5,648-653). La microalga *Phaeodactylum tricor-
nutum* es una fuente
potencial de EPA porque es un alga de crecimiento rápido.(Molina G et Al, Outdoor Chemostat Culture
of *Phaeodactylum tricor-
nutum* Utex 640 in a tubular Photobioreactor for the production of Eicosapentaenoic
40 Acid. Biotechnol. Appl. Biochem, 1994,20 :279-290), han logrado una producción de EPA al aire libre
de hasta 47,8 mg día⁻¹ litro⁻¹. Una ventaja adicional de esta especie es que los contenidos de ácido
docosahexaenoico (DHA) y de ácido araquidónico (AA) son bajos o insignificantes, lo cual tiene ventajas
importantes para simplificar la recuperación del EPA.

(Cohen Z and Cohen S, Preparation of Eicosapentaenoic Acid Concentrate from *Porphyridium cruen-
tum*.J. Am. Oil Chem. Soc, 1991, 68:1,16-19) obtuvieron EPA, procedente de *Porphyridium cruen-
tum*
45 mediante un proceso en cinco etapas: extracción de lípidos con Cl₃CH-CH₃OH-H₂O (2:1:0,8 v:v);
fraccionamiento, de los lípidos en neutros, glicolípidos y fosfolípidos; transmetilación de la fracción de gli-
colípidos; concentración por el método de la urea de los ésteres metílicos y purificación por cromatografía
de fase inversa a presión atmosférica. Mediante un proceso similar (Cohen et Al, Production and Partial
50 Purification of γ -Linolenic Acid and some Pigments from *Spirulina platensis*. J. Appl. Phycol, 1993,
5:109-115) obtuvieron el ácido γ -linolénico (GLA) con un 90% de pureza a partir del alga verde-azulada
Spirulina platensis.

(Molina G et al, Comparison between Extraction of Lipids and Fatty Acids from Microalgal Bio-
mass, J. Am. Oil Chem. Soc, 1994,71:9,955-959) y (Robles M et al, Concentration and Purification of
55 Stearidonic, Eicopentaenoic, and Docosahexaenoic Acids from Cod Liver Oil and the Marine, Microalga
Isochrysis galbana, J. AM. Oil Chem, 1995, 72:5,575-583) han desarrollado un proceso de tres etapas
para obtener PUFAs de alta pureza a partir de la microalga marina *Isochrysis galbana* y (Cartens et al,
Eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n3) from the Microalga *Phaeodactylum tricor-
nutum*. J. Am. Oil Chem.
60 Soc, 1996, in press) han aplicado este proceso a la microalga *P. tricor-
nutum*. Estas etapas son: extracción
de los ácidos grasos por saponificación directa de la biomasa liofilizada; enriquecimiento en PUFAs por
el método de la urca y purificación de determinados PUFAs por HPLC (cromatografía líquida de alta

resolución) a nivel semipreparativo, (cromatografía de baja carga).

Compendio de la invención

5 Esta invención proporciona un método para la obtención de ácido Eicosapentaenoico (EPA) de alta pureza que le hace adecuado para su empleo en ensayos clínicos y en la prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares, inflamaciones y cáncer.

Descripción detallada de la invención

10 Esta invención se refiere a la obtención de ácido Eicosapentaenoico, (EPA) de alta pureza a partir de la microalga *Phaeodactylum tricornutum*, mediante un proceso de tres etapas: extracción de los ácidos grasos por saponificación directa de la biomasa húmeda; concentración de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) por el método de la urea y purificación del EPA por HPLC (cromatografía líquida de alta
15 resolución). Todos estos aspectos se describirán con más detalle a continuación, apoyados en el diagrama de flujo de la figura 1.

1. Biomasa microalgal

20 Como muestra el diagrama de flujo de la figura 1, las células de *Phaeodactylum tricornutum* se cultivan en un fotobiorreactor tubular externo, son cosechadas por centrifugación u 4000 r.p.m. y almacenadas a -18°C hasta su utilización. La biomasa húmeda contiene un 20,9±1,3% en peso de biomasa seca. El contenido medio de ácidos grasos en la biomasa seca es del 9,4% en peso seco.

25 2. Extracción de ácidos grasos de la biomasa húmeda

Como muestra el diagrama de flujo de la figura 1, para extraer los ácidos grasos, 480 g de biomasa húmeda (100 g de biomasa seca) se tratan con 160 g de KOH previamente disueltos en etanol (96% v:v), siendo la relación óptima: etanol (96%) biomasa seca de 57 ml/g (Tabla 1). La extracción de los ácidos
30 grasos se lleva a cabo a 60°C, durante 1 h, con agitación y en atmósfera de nitrógeno. La mezcla obtenida se filtra y el residuo de biomasa se lava con etanol (96%) (2L), uniéndose el filtrado de lavado al primer filtrado. A continuación se añade agua hasta un contenido total en la misma del 40% en peso y se extraen los insaponificables con hexano (relación hexano/disolución hidroalcohólica de 1,85 v:v, repartiendo el volumen total de hexano en cinco extracciones). A la fase hidroalcohólica que contiene las sales potásicas
35 de los ácidos grasos se le añade ácido clorhídrico del 35% (HCL) hasta, PH=1 para transformar las sales potásicas en ácidos, Los ácidos grasos obtenidos de esta manera se recuperan con hexano (relación hexano/disolución hidroalcohólica de 0,8 en volumen, repartiendo el volumen total de hexano en cuatro extracciones). Se extrae el 90,9% del EPA contenido en la biomasa.

40 El etanol (96%) fue el disolvente más eficiente en la extracción de ácidos grasos por saponificación directa de la biomasa liofilizada de *Isochysis galbana* (Molina G et al, Comparison between Extraction of Lipids and Fatty Acids from Microalgal Biomass. J. Am. Oil Chem. Soc, 1994, 71:9,955-959 con un rendimiento del 79,18% de ácidos grasos totales y también a partir de biomasa liofilizada de *Phaeodactylum tricornutum* (Cartens et al, Eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n3) from the Microalga *Phaeodactylum tricornutum*. J. Am. Ofi Chem. Soc, 1996, in press) con un rendimiento del 96,2%.
45

En esta invención, los ácidos grasos son obtenidos directamente de la biomasa húmeda y se ha optimizado la relación etanol/biomasa. La tabla 1 muestra los rendimientos en ácidos grasos a partir de la biomasa húmeda, que son similares a los obtenidos a partir de la biomasa liofilizada de *Phaeodactylum tricornutum*. Por tanto, la liofilización puede ser eliminada, ahorrando la alta cantidad de energía que se consume en esta etapa.
50

55

60

TABLA 1

	Etanol (96%)/ biomasa seca (ml/g)	Etanol(96%)/ biomasa húmeda (ml/g)	Rendimiento en ácidos grasos (%)	Rendimiento en EPA (%)
5				
10	14	2.9	86.3	89.7
	19	4.0	86.9	88.5
	38	7.9	88.5	89.2
	57	11.9	90.6	90.9
15	76(*)	15.9	90.4(96.2)	92.1(98.3)
	95	19.9	90.0	92.2

(*) Entre paréntesis, rendimientos obtenidos cuando se utiliza biomasa liofilizada.

20 Los rendimientos en la extracción de ácidos grasos y de EPA disminuyen con la relación etanol (96%)/biomasa (tabla 1). A la vista de los resultados que se muestran en esta tabla se ha elegido una relación etanol (96%)/biomasa seca de 57 ml/g. Esta relación disminuye los costos de extracción con respecto a la relación empleada con biomasa liofilizada de *Isochrysis galbana* (Molina Grima et al, Comparison between Extraction of Lipids and Fatty Acids from Microalgal Biomass, J. Arn. Oil Chem, 1994, 71:9,955-959) (Robles Medina et al, Obtención de Concentrados de Acidos Grasos Poliinsaturados por el Método de los Compuestos de Inclusión de Urea, grasas y Aceites, 1995, 423,174-182), y de *Phaeodactylum tricornutum* (Cartens et al, eicosapentenoic Acid (EPA, 20:5n3) from. Microalga Phaeodactylum tricornutum. J. Am. Ofi Chem. Soc, 1996, in press) que es igual a la empleada en el método de (Bligh EG and Dyer WJ, A Rapid method of total Lipid Extraction and Purification, Can.J.Biochem.Physiol, 1959, 37:911-917).

35 Por otra parte, se han evitado los problemas relacionados con la formación de emulsiones separando la biomasa de la disolución de las sales potásicas de los ácidos grasos antes de añadir el hexano para la extracción de los insaponificables.

3. Concentración de los PUFAs del extracto de ácidos grasos

40 De acuerdo con el diagrama de flujo de la figura 1,25g de ácidos grasos se añaden a una disolución caliente (65-70°C) de 10 g de urca en 267 ml de metanol (relación urea/ácidos grasos 4:1 p:p), agitando constantemente hasta que la disolución queda completamente transparente, La urca y los aductos urca-ácidos grasos se dejan cristalizar durante toda una noche a 28°C. Después se filtra y el filtrado que contiene los PUFAs se introduce en una columna de destilación o en un rotavapor para eliminar gran parte del metanol. Los PUFAs se extraen con hexano (previa adición de, Agua para mejorar la extracción). El rendimiento en la recuperación del EPA en esta etapa es del 78,6%.

45 Mediante este procedimiento el contenido de EPA se incrementa desde un 36,3% en el extracto hasta un 55,2% en el concentrado de urca (factor de concentración 55,2/36,3=1,5). Este factor es menor que el que se obtuvo con aceite de hígado de bacalao o con el extracto de *Isochrysis galbana* (que fueron de 3,1 con el primero en las mismas condiciones experimentales y 1,7 con el segundo pero utilizando 4°C como temperatura de cristalización, (Robles Medina et al, Concentration and Purification of Stearidonic, Eicosapentenoic, and Docosahexaenoic Acids from Cod Liver Oil and the Marine Microalga *Isochrysis galbana*, J. Am. Oil Chem. Soc, 1995, 72:5,575-583) y (Robles M et al, Obtención de Concentrados de Acidos grasos Poliinsaturados por el método de los Compuestos de Inclusión de Urea, Grasa y Aceites, 1995, 42:3,174-182). Esto es lógico dado que el factor de concentración es tanto más pequeño cuanto mayor es el contenido en PUFAs de la disolución de partida, ya que la cantidad de ácidos grasos saturados y monoinsaturados a eliminar es menor y el extracto de *P. tricornutum* tiene un contenido en PUFAs del 59,6%, mientras que las concentraciones de PUFAs del aceite de hígado de bacalao y del extracto de *I. galbana* fueron del 27,6% y 41,2%, respectivamente (Robles Medina et al, Concentration and Purification of Stearidonic, Eicosapentenoic, and Docosahexaenoic Acids from Cod Liver Oil and the Marine Microalga *Isochrysis galbana*, J. Am. Oil Chem. Soc, 1995, 72:5,174-182) Además, para obtener el concentrado de *I. galbana* se utilizó una temperatura de cristalización de 4°C (temperatura que resulta más adecuada para concentrar todos los PUFAs y no sólo el EPA, (Robles M et al, Obtención de Concentrados de Acidos

Grasos Poliinsaturados por el Método de los Compuestos, de Inclusión de Urea, Grasa y Aceites, 1995, 42:3,741-182) y a esta temperatura el factor de concentración del EPA es mayor aunque el rendimiento en su recuperación es menor que a 28°C (a 4°C el rendimiento en la recuperación del EPA fue tan sólo del 54,3%, (Robles Medina et al, Concentration and Purification of Stearidonic, Eicosapentaenoic, and Docosahexaenoic Acids from Cod Liver Oil and the Marine Microalga Isochrysis galbana, J. Am. Chem. Soc, 1995, 72:5,575-583).

4. Purificación final del EPA por HPLC

De acuerdo con el diagrama de flujo de la figura 1, la purificación del EPA se, lleva a cabo mediante la separación de una fracción de muy alta pureza en EPA por HPLC (cromatografía líquida de alta resolución). En un cartucho de compresión radial de 4,7 cm de diámetro interno (d.i.) x 30 cm de longitud (fase inversa C₁₈, 37-55 μm de tamaño de partícula, 12,5 min de tamaño de poro) se cargan 0,635 g del concentrado de urea descrito anteriormente. Como fase móvil se utiliza metanol-agua (1% de ácido acético, AcH) 80:20 p:p a un caudal de 66ml/min. A la fracción rica en EPA que se sale de la columna se le elimina el metanol en una columna de destilación o en un rotavapor y se extrae el EPA mediante hexano. El 97,3% del EPA cargado en la columna cromatográfica se recuperó alcanzándose una pureza del 95,8%.

En esta invención, la purificación del EPA por HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) se lleva a cabo a escala preparativa (cromatografía de alta carga), lo que le confiere una mayor aplicabilidad industrial.

La cantidad media de EPA que puede ser obtenida mediante un proceso en tres etapas es de 2,46 g/día. Esta cantidad está limitada tanto por la productividad de biomasa de *P. tricornutum* que puede ser obtenida en el fotobiorreactor tubular externo de 200 l de capacidad, como por el número de cargas de 0,635 g de concentrado de PUFAs que en la columna preparativa en una jornada de 8 horas de trabajo. El rendimiento global del proceso de tres etapas es del 69,5% de EPA.

Este mismo proceso podría aplicarse, quizás con ligeras modificaciones, a otras microalgas y a la obtención de otros PUFAs, como los ácidos araquidónico y docosahexaenoico.

5. Análisis de los ácidos grasos

El análisis cualitativo y cuantitativo de todos los ácidos grasos se ha realizado por cromatografía de gases. Los ácidos grasos que han sido reconocidos y tenidos en cuenta para los cálculos de purezas y rendimientos han sido los siguientes: 14:0,16:0, 16:1n-7,16:2n-4, 16:3n-4, 16:4n-1,18:0, 18:1n-7, 18:1n-9, 18:2n-6, 18:3n-3, 18:4n-3,22:0, 20:4n-6, 20:4n-3, 20:5n-3(EPA), 24:0 y 22:6n-3.

Para comprobar que durante el proceso de obtención de EPA no, sufre oxidación, se han realizado espectros de absorción ultravioleta. La oxidación provoca la conjugación de dobles enlaces y ésta puede ser detectada por la aparición de bandas: de absorción a 234-237 nm si se forman trienos; o a 268 nm si se forman tetraenos (Kates, Techniques of Lipidology, 2nd printing 2nd edition. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Netherlands, 1988, pp. 168-170). En ningún caso se observó la aparición de estas bandas.

Descripción del dibujo

Para complementar la describe se está realizando y con objeto de descripción que ayude a una mejor descripción, de las características del invento, se acompaña a la presente memoria descriptiva y como parte integrante de la misma la figura 1.

La figura 1 representa el diagrama de flujo del proceso de obtención del ácido eicosapentaenoico (EPA) a partir de la microalga *Phaeodactylum tricornutum* mediante un proceso de 3 etapas: extracción de ácidos grasos por saponificación, directa de la biomasa húmeda; concentración de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) por el método de la urea y purificación del EPA por cromatografía líquida de alta resolución.

El proceso de obtención de ácido eicosapentaenoico queda claramente representado en la descripción, sin embargo es fundamental indicar los elementos necesarios para que se lleve a cabo dicho proceso:

Elemento 1: Cultivo procedente del fotobiorreactor.

Elemento 2: Centrifugador.

Elemento 3: Congelador.

Elemento 4: Tanque con agitador.

5 Elemento 5: Filtro.

Elemento 6: Torre de extracción.

Elemento 7: Torre de destilación.

Elemento 8: Cristalizador.

10 Elemento 9: Columna de preparación de HPLC.

Como muestra el diagrama de flujo de la figura 1, las células de *Phacodactylum tricornerutum* (1), se cultivan en un fotobiorreactor tubular externo, son cosechadas por centrifugación (2) a 4000 r.p.m. y almacenadas a -18 °C (3) hasta su utilización. La biomasa húmeda contiene un 20,9±1,3% en peso de biomasa seca. El contenido medio de ácidos grasos en la biomasa seca es del 9,4% en peso seco.

Para extraer los ácidos grasos, 480,g de biomasa húmeda (10,0 g de biomasa seca) se tratan con 160 g de KOH previamente disueltos en etanol (96% v:v), siendo la relación óptima: etanol (96%)/biomasa seca de 57ml/g. La extracción de los ácidos grasos se lleva a cabo a 60°C, durante 1 h, con agitación (4) y en atmósfera de nitrógeno. La mezcla obtenida se filtra (5) y el residuo de biomasa se lava con etanol (96%) (2L), uniéndose el filtrado de lavado al primer filtrado. A continuación se añade agua hasta un contenido total en la misma del 40% en peso, y se extraen los insaponificables con hexano (6) (relación hexano/disolución hidroalcohólica de 1,85 v:v, repartiendo el volumen total de hexano en cinco extracciones). A la fase hidroalcohólica que contiene las sales potásicas de los ácidos grasos se le añade ácido clorídrico del 35%(HCL) hasta PH=1 para transformar las sales potásicas en ácidos. Los ácidos grasos obtenidos de esta manera se recuperan con hexano (7) (relación hexano/disolución hidroalcohólica de 0,8 en volumen, repartiendo el volumen total de hexano en cuatro extracciones). Se extrae el 90,9% del EPA contenido en la biomasa.

30 En esta invención, los ácidos grasos son obtenidos directamente de la biomasa húmeda y se ha optimizado la relación etanol/biomasa.

Por otra parte, se han evitado los problemas relacionados con la formación de emulsiones separando la biomasa de la disolución de las sales potásicas de los ácidos grasos (7) antes de, añadir el hexano para la extracción de los insaponificables.

De acuerdo con el diagrama de flujo de la figura 1, 1,25g de ácidos grasos se añaden a una disolución caliente (65-70°C) de 10g de urea en 267ml de metanol (relación urea/ácidos grasos 4:1 p:p), agitando (4) constantemente hasta que la disolución queda completamente transparente. La urea y los aductos urea-ácidos grasos se dejan cristalizar (8) durante toda una noche a 28°C. Después se filtra (5) y el filtrado que contiene los PUFAs se introduce en una columna de destilación (7) o en un rotavapor para eliminar gran parte del metanol. Los PUFAs se extraen con hexano (6) (previa adición de agua para mejorar la extracción). El rendimiento en la recuperación del EPA en esta etapa es del 78,6%.

45 De acuerdo con el diagrama de flujo de la figura 1, la purificación del EPA se lleva a cabo mediante la separación de una fracción de muy alta pureza en EPA por HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) (9). En un cartucho de compresión radial de 4,7 cm de diámetro interno (d.i.) x 30 cm de longitud (fase inversa C₁₈, 37-55 μm de tamaño de partícula, 12,5 nm de tamaño de poro) se cargan 0,635 g del concentrado de urea descrito anteriormente. Como fase móvil se utiliza metanol-agua (1% de ácido acético, AcH) 80:20 p:p a un caudal de 66ml/min. A la fracción rica en EPA que sale de la columna se le elimina el metanol en una columna de destilación (7) o en un rotavapor y se extrae el EPA mediante hexano (6). El 97,3% del EPA cargado en la columna cromatográfica se recuperó alcanzándose una pureza del 95,8%.

55

60

REIVINDICACIONES

1. Obtención de ácido eicosapentaenoico (EPA) de alta pureza a partir de la microalga *Phaeodactylum tricornutum* mediante un proceso de 3 etapas; **caracterizado** porque las células de *Phaeodactylum tricornutum* se cultivan en un fotobiorreactor tubular externo, son cosechadas por centrifugación a 4000 r.p.m. y son almacenadas a -18°C , siendo el contenido medio en ácidos grasos de la biomasa del 9,4% en peso.
2. Obtención de ácido eicosapentaenoico (EPA) de alta pureza a partir de la microalga *Phaeodactylum tricornutum* según la reivindicación anterior **caracterizado** porque la extracción de los ácidos grasos de la biomasa húmeda se realiza con una relación etanol (96% v:v)/biomasa seca de 57ml/g, habiendo disuelto previamente, 5,85 g de KOH/L de etanol (96%).
3. Obtención de ácido eicosapentaenoico (EPA) de alta pureza a partir de la microalga *Phaeodactylum tricornutum* según reivindicaciones 1 y 2, llevándose a cabo la extracción de los ácidos grasos de la biomasa húmeda a 60°C , durante 1 h, con agitación continua y en presencia de nitrógeno.
4. Obtención de ácido eicosapentaenoico (EPA) de alta pureza a partir de la microalga *Phaeodactylum tricornutum* según reivindicaciones 1, 2 y 3 en la que la mezcla obtenida según las reivindicaciones 2 y 3 es filtrada; el residuo de biomasa es lavado con 2L de etanol (96%) y filtrado de nuevo uniéndose a los dos filtrados.
5. Obtención de ácido eicosapentaenoico (EPA) de alta pureza a partir de la microalga *Phaeodactylum tricornutum* según reivindicaciones 1, 2, 3, 4, realizándose, la extracción de los insaponificables añadiendo agua hasta un 40% en peso y realizando 5 extracciones con un volumen de hexano tal que la relación hexano/disolución hidroalcohólica es de 1,85 v
6. Obtención de ácido eicosapentaenoico (EPA) de alta pureza a partir de la microalga *Phaeodactylum tricornutum* según reivindicaciones anteriores, realizándose la transformación de las sales potásicas de los ácidos grasos en ácidos libres añadiendo ácido clorhídrico del 35% (HCL) hasta $\text{PH}=1$ a la disolución hidroalcohólica obtenida.
7. Obtención de ácido eicosapentaenoico (EPA) de alta pureza a partir de la microalga *Phaeodactylum tricornutum* según reivindicaciones anteriores, en la que los ácidos grasos obtenidos según la reivindicación 6 se recuperan realizando cuatro extracciones con un volumen total de hexano tal que la relación hexano/disolución hidroalcohólica sea de 0,8 v:v.
8. Obtención de ácido eicosapentaenoico (EPA) de alta pureza a partir de la microalga *Phaeodactylum tricornutum* según reivindicaciones anteriores, siendo el rendimiento de la extracción del EPA del 90,9%.
9. Obtención de ácido eicosapentaenoico (EPA) de alta pureza a partir de la microalga *Phaeodactylum tricornutum* según reivindicaciones anteriores, en la que la concentración de los PUFAs del extracto obtenido se lleva a cabo mediante reacción con la urea, utilizando metanol como disolvente, con una relación urea/ácidos grasos 4:1 p:p y a una temperatura de cristalización de 28°C .
10. Obtención de ácido eicosapentaenoico de alta pureza (EPA) a partir de la microalga *Phaeodactylum tricornutum* según reivindicaciones anteriores, en la cual los aductos de urea se separan por filtración y el filtrado se lleva a una columna de destilación o a un rotavapor para eliminar el metanol; a continuación se extraen los PUFAs con hexano.
11. Obtención de ácido eicosapentaenoico (EPA) de alta pureza a partir de la microalga *Phaeodactylum tricornutum* según reivindicaciones anteriores en la cual el incremento del contenido en EPA que se consigue según la reivindicación 9 va desde un 36,3% en el extracto hasta un 55,2% en el concentrado de urea (factor de concentración 1,5).
12. Obtención de ácido eicosapentaenoico (EPA) de alta pureza a partir de la microalga *Phaeodactylum tricornutum* según reivindicaciones anteriores, siendo el rendimiento en la recuperación del EPA según las reivindicaciones 9 y 10 del 78,6%
13. Obtención de ácido eicosapentaenoico (EPA) de alta pureza a partir de la microalga *Phaeodactylum tricornutum* según reivindicaciones anteriores, siendo la purificación final del EPA mediante HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución) a escala preparativa en un cartucho de compresión radial de 4,7 cm d.i. x 30 cm, fase inversa C_{18} , 37-55 μm de tamaño de partícula y 12 nm de tamaño de poro.

ES 2 120 898 B1

14. Obtención de ácido eicosapentaenoico (EPA) de alta pureza a partir de la microalga *Phaeodactylum tricornerutum* según reivindicaciones anteriores siendo cargados 0,635 g del concentrado de PUFAs según reivindicaciones 9 y 10 y como fase móvil se utiliza metanol-agua, (1%ACh) 80:20 p:p a un caudal de 66ml/min.

15. Obtención de ácido eicosapentaenoico (EPA) de alta pureza a partir de la microalga *Phaeodactylum tricornerutum* según reivindicaciones anteriores, siendo recuperado el 97,3% del EPA que entra en el cartucho cromatográfico con una pureza del 95,8%.

16. Obtención de ácido eicosapentaenoico (EPA) de alta pureza a partir de la microalga *Phaeodactylum tricornerutum* según reivindicaciones anteriores, obteniéndose por cada 100 g/día de biomasa seca de *Phaeodactylum tricornerutum* cultivada en un fotobiorreactor tubular externo de 200 l, 2,46g/día de EPA del 95,8% de pureza, siendo el rendimiento del conjunto del proceso de tres etapas del 69,5%.

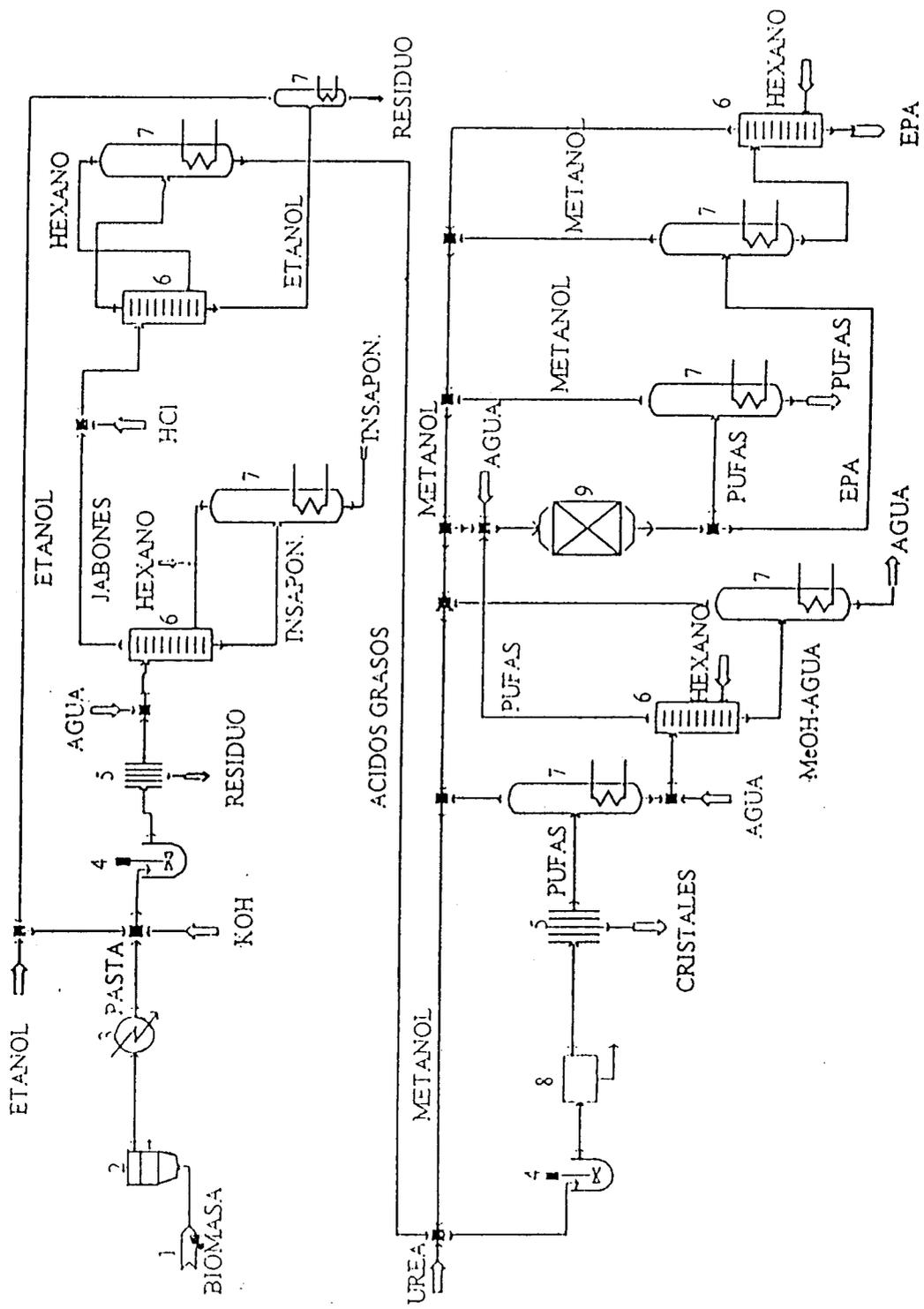


Figura 1



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁶: C07C 57/03, C12N 1/12

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	CARTENS, M. et al., "Eicosapentaenoic acid (20:5n-3) from the marine microalga Phaeodactylum tricornutum", agosto 1996, JAOCS, 73 (8), páginas 1025-1031, todo el documento.	1-15
A	REIS, A. et al., "Eicosapentaenoic acid-rich biomass production by the microalga Phaeodactylum tricornutum in a continuous-flow reactor", 1996, Bioresource Technol., 55, páginas 83-88, todo el documento.	1-16
A	YONGMANITCHAI, W. et al., "Growth of and omega-3 fatty acid production by Phaeodactylum tricornutum under different culture conditions", 1991, Applied and Environmental Microbiol., 57 (2), páginas 419-425, todo el documento.	1-16
A	MOLINA GRIMA, E. et al., "Biomass and eicosapentaenoic acid productivities from an outdoor batch culture of Phaeodactylum tricornutum UTEX 640 in an airlift tubular photobioreactor", 1995, Appl. Microbiol. Biotechnol., 42, páginas 658-663, todo el documento.	1-16
A	ROBLES MEDINA, A. et al., "Obtención de concentrados de ácidos grasos poliinsaturados por el método de los compuestos de inclusión de urea", 1995, Grasas y Aceites, 48 (3), páginas 174-182, todo el documento.	9,10

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
28.07.98

Examinador
A. Maquedano Herrero

Página
1/1