



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 289 898**

21 Número de solicitud: 200502741

51 Int. Cl.: **C11B 1/10** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **10.11.2005**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **01.02.2008**

Fecha de la concesión: **21.11.2008**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **16.12.2008**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente: **16.12.2008**

73 Titular/es: **Universidad de Almería OTRI, Edificio Central Ctra. Sacramento, s/n 04120 La Cañada de San Urbano, Almería, ES**

72 Inventor/es: **Campra Madrid, Pablo; Guiel Guerrero, José Luis y López Martínez, Juan Carlos**

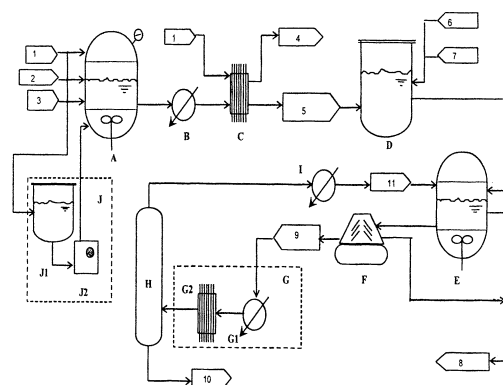
74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

54 Título: **Método rápido y biocompatible de extracción, saponificación y concentración de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS) por diferencias de solubilidad a partir de biomasa.**

57 Resumen:

Método rápido y biocompatible de extracción, saponificación y concentración de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS) por diferencias de solubilidad a partir de biomasa.

La invención proporciona un método para preparar un concentrado de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS) a partir de biomasa que comprende: (a) extraer y saponificar la biomasa mediante tratamiento con un alcohol inferior y un hidróxido de metal alcalino a 75-90°C; (b) enfriar la mezcla obtenida en (a) para obtener una fase líquida y una fase sólida; (c) filtrar la fase sólida a la temperatura de enfriamiento; (d) acidificar el filtrado; (e) extraer el filtrado acidificado con un disolvente orgánico; y (f) purificar el extracto destilando el disolvente; en el que en la etapa (a) el alcohol inferior es etanol absoluto y el hidróxido de metal alcalino es hidróxido sódico sólido; y el enfriamiento de la etapa (b) y la filtración de la etapa (c) se llevan a cabo a una temperatura de 0-4°C. El concentrado de PUFAS así obtenido puede usarse en la industria agroalimentaria, farmacéutica o química.



ES 2 289 898 B1

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

DESCRIPCIÓN

Método rápido y biocompatible de extracción, saponificación y concentración de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS) por diferencias de solubilidad a partir de biomasa.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método encuadrado en el sector técnico de la obtención de concentrados de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS, Poly Unsaturated Fatty Acids). Este método se ha desarrollado con el objeto de mejorar la eficacia de los métodos de concentración que son de empleo común en la industria agroalimentaria y farmacéutica, así como para disminuir potenciales peligros para la salud de los concentrados de PUFAS obtenidos mediante estos métodos. Mediante éste método se obtienen concentrados de PUFAS que pueden comercializarse como complementos nutricionales o como materia prima para conseguir determinados PUFAS de alta pureza.

15 **Antecedentes de la invención**

Los métodos comúnmente empleados para obtener fracciones ricas en PUFAS a partir de fuentes naturales están basados en diferencias de polaridad o configuración espacial de los ácidos grasos presentes en extractos lipídicos. Estas diferencias están mayoritariamente asociadas al número de dobles enlaces presentes en la cadena de carbonos y por ello los PUFAS pueden ser separados de acuerdo a sus diferentes grados de insaturación.

Entre los métodos más comúnmente empleados están la cristalización en frío o *winterización* y el método de formación de complejos con la urea. Sin embargo, el uso del método de la urea en productos destinados al consumo humano debería restringirse dado que la reacción de la urea con etanol o metanol produce etil o metil-carbamatos, los cuales son conocidos carcinógenos animales. Otros métodos empleados son diferentes tipos de técnicas cromatográficas (HPLC y cromatografía líquida en columna de gel de sílice y nitrato de plata).

En la patente JP 59-21641, 1984, de Kureha Chem. Co se describe un método para concentrar ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) a partir de aceite de pescado basado en diferencias de solubilidad de sales de PUFAS, tratando el aceite con una solución de un hidróxido alcalino en etanol que contiene menos de un 20% de agua. Dicha técnica es análoga a la descrita en la presente invención, si bien nunca se ha ensayado este proceso directamente y en una sola etapa a partir de la biomasa.

Los presentes inventores han descubierto ahora que tratando directamente la biomasa con etanol absoluto e hidróxido sódico sólido (es decir, en ausencia de agua) a una temperatura de trabajo adecuada, se consigue simultáneamente extraer y saponificar los ácidos grasos poliinsaturados de la biomasa, además de conseguir una concentración adicional de las sales de dichos ácidos grasos poliinsaturados obtenidas, lo cual supone una mejora del método de Kureha. El control de la temperatura de enfriamiento, además, permite una buena separación de las sales de dichos ácidos grasos poliinsaturados, mejorando así el rendimiento final en cuanto al contenido de ácidos grasos poliinsaturados en el concentrado final.

Así pues, la presente invención pretende proporcionar un método alternativo de obtención de un concentrado de ácidos grasos poliinsaturados con un buen rendimiento y que es menos complejo y, por tanto, más rápido y menos costoso.

45 **Objeto de la invención**

La presente invención, por tanto, tiene por objeto proporcionar un método para la preparación de un concentrado de ácidos grasos poliinsaturados a partir de biomasa.

Otro objeto de la invención es proporcionar un concentrado de ácidos grasos poliinsaturados.

Por último, otro objeto de la invención es proporcionar el uso de dicho concentrado de ácidos grasos poliinsaturados en la industria agroalimentaria, farmacéutica o química.

55 **Breve descripción de las figuras**

La Figura 1 representa un diagrama de flujo del método de extracción, saponificación y concentración de PUFAS de la invención a partir de una biomasa de semillas oleaginosas.

60 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención proporciona un método (en adelante “método de la invención”) para la preparación de concentrados de ácidos grasos poliinsaturados a partir de biomasa que comprende las etapas de:

65 (a) extracción y saponificación de la biomasa mediante tratamiento con un alcohol inferior y con un hidróxido de metal alcalino a una temperatura de 75-90°C;

ES 2 289 898 B1

(b) enfriamiento de la mezcla obtenida en la etapa (a) para obtener una fase líquida y una fase sólida;

(c) filtración de la fase sólida a la temperatura de enfriamiento;

5 (d) acidificación del filtrado;

(e) extracción del filtrado acidificado con un disolvente orgánico; y

10 (f) purificación del extracto obtenido en (e) mediante destilación del disolvente, para obtener un concentrado de ácidos grasos poliinsaturados;

en el que en la etapa (a) el alcohol inferior es etanol absoluto y el hidróxido de metal alcalino es hidróxido sódico sólido; y en el que el enfriamiento de la etapa (b) y la filtración de la etapa (c) se llevan a cabo a una temperatura de 0-4°C.

15 De este modo, en la etapa (a) se extraen y se separan simultáneamente las sales sódicas de los ácidos grasos de acuerdo a su diferente solubilidad en etanol. Está basado en el hecho de que los jabones sódicos de un ácido graso son más tanto más solubles en etanol a temperatura ambiente, cuanto mayor sea el número de dobles enlaces en las cadenas hidrocarbonadas y menor es la longitud de dichas cadenas, para el mismo grado de insaturación.

20 En una realización particular del método de la invención, el tratamiento de la etapa (a) se lleva a cabo a una temperatura de 82°C.

25 El método de la invención, por tanto, se ha de llevar a cabo en un reactor de temperatura controlada. Asimismo, se ha de efectuar con constante agitación y en atmósfera de argón. En una realización preferida, el tratamiento de la etapa (a) se lleva a cabo durante 2 horas con agitación constante y en atmósfera de argón.

30 Como medio de extracción-saponificación se emplea como alcohol inferior el etanol absoluto y como hidróxido de metal alcalino el hidróxido sódico sólido, tal y como se ha descrito previamente.

35 Así, en una realización particular del método de la invención, el tratamiento de la etapa (a) se lleva a cabo con etanol absoluto en una proporción etanol/biomasa de 5-55 ml/g. En otra realización particular del método de la invención, el tratamiento de la etapa (a) se lleva a cabo con hidróxido sódico sólido en una proporción hidróxido sódico/biomasa de 0,2 g/g.

El alcohol inferior, el hidróxido de metal alcalino y la biomasa se cargan al reactor directamente o bien, si se desea, se someten a una etapa opcional de mezclado y sonicado previa a su introducción al reactor.

40 En otra realización particular del método de la invención, el enfriamiento de la etapa (b) y la filtración de la etapa (c) se llevan a cabo a una temperatura de 4°C.

Tras enfriar la solución en la etapa (b) se obtienen dos fases:

45 - Una fase líquida que contiene el concentrado de sales de PUFAS, y

- Una fase sólida que contiene los ácidos grasos saturados.

50 Para separar dichas fases se procede a su filtración a la temperatura de enfriamiento, es decir, a 4°C, con la ayuda de un filtro con un tamaño de poro adecuado, por ejemplo 100-160 μm , y posterior lavado con etanol absoluto.

Para incrementar el rendimiento total de extracción puede añadirse el filtrado a la fase líquida, evaporando posteriormente el disolvente mediante cualquier técnica convencional empleando, por ejemplo, un rotavapor al vacío a una temperatura adecuada.

55 Para eliminar la porción insaponificable del aceite, seguidamente se redissuelve el extracto en un disolvente adecuado, por ejemplo hexano, y se añade agua. La capa superior hexánica con la materia insaponificable se retira y se desecha, quedando los jabones de los PUFAS en medio acuoso.

60 Para obtener los PUFAS en forma de ácidos grasos libres, la fase acuosa con las sales de PUFAS se acidifica a un pH muy bajo, por ejemplo a $\text{pH} = 1$, empleando un ácido mineral tal como una solución de ácido clorhídrico en agua en una proporción de 1:1 en volumen. Seguidamente, los ácidos grasos libres se extraen completamente mediante extracción con un disolvente orgánico. En una realización preferida del método de la invención, en la extracción de la etapa (e) el disolvente orgánico es hexano. Así, por ejemplo, se realizan una serie de extracciones con pequeños volúmenes de disolvente (8 extracciones con 20 ml de hexano cada una, por ejemplo). Después, el extracto hexánico se lava con agua hasta pH neutro. Finalmente, el concentrado de PUFAS se obtiene en estado puro evaporando el disolvente hexano por destilación.

ES 2 289 898 B1

Opcionalmente, y previamente a la destilación final, se puede incrementar la pureza del concentrado final de PUFAS realizando una *winterización* o cristalización en frío mediante el enfriamiento del extracto hexánico a -70°C y posterior filtración a esa temperatura de los cristales así formados.

5 Así, en una realización particular, el método de la invención comprende una etapa adicional de cristalización en frío del extracto obtenido en (e) previa a la purificación por destilación de la etapa (f).

10 En otra realización particular, el método de la invención comprende una etapa adicional de trituración y liofilización de la biomasa previa al tratamiento de la etapa (a). Dichas operaciones son especialmente indicadas cuando se parte de una biomasa de semillas oleaginosas.

15 La biomasa de partida puede proceder de fuentes diversas. Así, en una realización particular del método de la invención, la biomasa es de origen vegetal. En una realización preferida, la biomasa procede de semillas oleaginosas o microalgas. En otra realización particular del método de la invención, la biomasa es de origen animal. En una realización preferida, la biomasa procede de aceites de pescado.

20 La composición del concentrado de PUFAS dependerá en principio del origen de la biomasa. Así, a partir de fuentes vegetales se obtienen ácidos grasos poliinsaturados tales como el ácido linoleico, linolénico o estearidónico; mientras que a partir de fuentes animales se obtienen los ácidos eicosa-pentaenoico y docosahexaenoico.

Por tanto, en una realización particular del método de la invención, se obtiene un concentrado de ácidos grasos poliinsaturados seleccionados entre ácido linoleico, linolénico, estearidónico, eicosa-pentaenoico y docosahexaenoico.

25 En otro aspecto de la invención, se proporciona un concentrado de ácidos grasos poliinsaturados obtenible por el método descrito previamente.

Finalmente, en otro aspecto de la invención, se proporciona el uso de dicho concentrado de ácidos grasos poliinsaturados en la industria agroalimentaria, farmacéutica o química.

30 En una realización particular, dicho concentrado se emplea en complementos nutricionales o como materia prima para la obtención de ácidos grasos poliinsaturados de alta pureza.

35 A continuación se presenta un ejemplo que ilustra el método de la invención y que en ningún caso debe considerarse limitativo del alcance de la presente invención

Ejemplo 1

40 *Extracción/saponificación/concentración de PUFAS a partir de una biomasa de semillas oleaginosas (Según Fig. 1)*

Como medio de extracción-saponificación se emplean 50 ml de etanol absoluto (1) y 0,2 g de hidróxido sódico (3) para 1 g de biomasa de semilla previamente triturada y liofilizada (2). Estos tres componentes iniciales se someten a mezclado y sonicado en un sistema (J) formado por un mezclador (J1) y un dispositivo de sonicado (J2) antes de introducirlos en el reactor (A). Este se mantiene a 82°C durante 2 h con constante agitación y bajo atmósfera de argón.

Finalizado dicho tratamiento, la solución saponificada se enfría a 4°C en un sistema de enfriamiento (B) obteniéndose dos fases:

- 50
- una fase líquida que contiene el concentrado de sales de PUFAS en etanol, y
 - una fase sólida que contiene los ácidos grasos saturados.

55 A continuación, la fase sólida se filtra a 4°C con la ayuda de un filtro de 100-160 μm de tamaño de poro en un sistema de filtración (C) y se lava con etanol absoluto (1) obteniendo un residuo (4).

60 Para incrementar el rendimiento total de extracción se añade el filtrado a la fase líquida, obteniendo así un concentrado de sales de PUFAS en etanol del que posteriormente se evapora el etanol en un rotavapor al vacío y a 35°C (no mostrado en la figura).

Para eliminar la porción insaponificable del aceite de semilla, seguidamente se redisuelve el extracto en 1 ml de hexano y se añaden 2,5 ml de agua. La capa superior hexánica con la materia insaponificable se retira y se desecha (no mostrado en la figura), quedando los jabones de los PUFAS en medio acuoso (5).

65 Para obtener los PUFAS en forma de ácidos grasos libres, la fase acuosa con las sales de PUFAS (5) se acidifica a $\text{pH} = 1$ en un mezclador (D) añadiendo ácido clorhídrico (7) y agua (6) en una proporción 1:1 (v/v). Seguidamente, los ácidos grasos libres se extraen completamente mediante 8 extracciones con 20 ml de hexano cada vez en un extractor (E) del que se retira un residuo (8). Después, el extracto hexánico se centrifuga en un sistema centrifugador (F) para

ES 2 289 898 B1

obtener una solución de PUFAS en hexano (9) que se lava con agua hasta pH neutro y se cristaliza en frío en un sistema de winterización (G) compuesto por un sistema de enfriamiento (G1) y un sistema de filtración (G2). Finalmente, se evapora el hexano mediante destilación en un destilador (H), obteniéndose así un concentrado de PUFAS puro (10). El hexano gas que sale del destilador se condensa en un condensador (I) obteniéndose hexano líquido (11) que se recircula al extractor (E).

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Método para la preparación de un concentrado de ácidos grasos poliinsaturados a partir de biomasa que comprende las etapas de:

- (a) extracción y saponificación de la biomasa mediante tratamiento con un alcohol inferior y con un hidróxido de metal alcalino a una temperatura de 75-90°C;
- 10 (b) enfriamiento de la mezcla obtenida en la etapa (a) para obtener una fase líquida y una fase sólida;
- (c) filtración de la fase sólida a la temperatura de enfriamiento;
- (d) acidificación del filtrado;
- 15 (e) extracción del filtrado acidificado con un disolvente orgánico; y
- (f) purificación del extracto obtenido en (e) mediante destilación del disolvente, para obtener un concentrado de ácidos grasos poliinsaturados;

20 **caracterizado** porque en la etapa (a) el alcohol inferior es etanol absoluto y el hidróxido de metal alcalino es hidróxido sodico sólido; y porque el enfriamiento de la etapa (b) y la filtración de la etapa (c) se lleva a cabo a una temperatura de 0-4°C.

25 2. Método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el tratamiento de la etapa (a) se lleva a cabo a una temperatura de 82°C.

3 3. Método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el tratamiento de la etapa (a) se lleva a cabo con etanol absoluto en una proporción etanol/biomasa de 5-55 ml/g.

30 4. Método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el tratamiento de la etapa (a) se lleva a cabo con hidróxido sodico sólido en una proporción hidróxido sodico/biomasa de 0,2 g/g.

35 5. Método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el tratamiento de la etapa (a) se lleva a cabo durante 2 horas con agitación constante y en atmósfera de argón.

6. Método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el enfriamiento de la etapa (b) y la filtración de la etapa (c) se lleva a cabo a una temperatura de 4°C.

40 7. Método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque en la extracción de la etapa (e) el disolvente orgánico es hexano.

8. Método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque comprende una etapa adicional de cristalización en frío del extracto obtenido en (e) previa a la purificación por destilación de la etapa (f).

45 9. Método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque comprende una etapa adicional de trituración y liofilización de la biomasa previa al tratamiento de la etapa (a).

10. Método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la biomasa es de origen vegetal.

50 11. Método según la reivindicación 10, **caracterizado** porque la biomasa son semillas oleaginosas o microalgas.

12. Método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la biomasa es de origen animal.

55 13. Método según la reivindicación 12, **caracterizado** porque la biomasa es un aceite de pescado.

14. Método según las reivindicaciones 1 a 13, **caracterizado** porque se obtiene un concentrado de ácidos grasos poliinsaturados seleccionados entre ácido linoleico, linolénico, estearidónico, eicosa-pentaenoico y docosaheptaenoico.

60 15. Concentrado de ácidos grasos poliinsaturados obtenible por el método de las reivindicaciones 1 a 14.

16. Uso del concentrado de ácidos grasos poliinsaturados según la reivindicación 15 en la industria agroalimentaria, farmacéutica o química.

65 17. Uso según la reivindicación 16, **caracterizado** porque se emplea en complementos nutricionales o como materia prima para la obtención de ácidos grasos poliinsaturados de alta pureza.

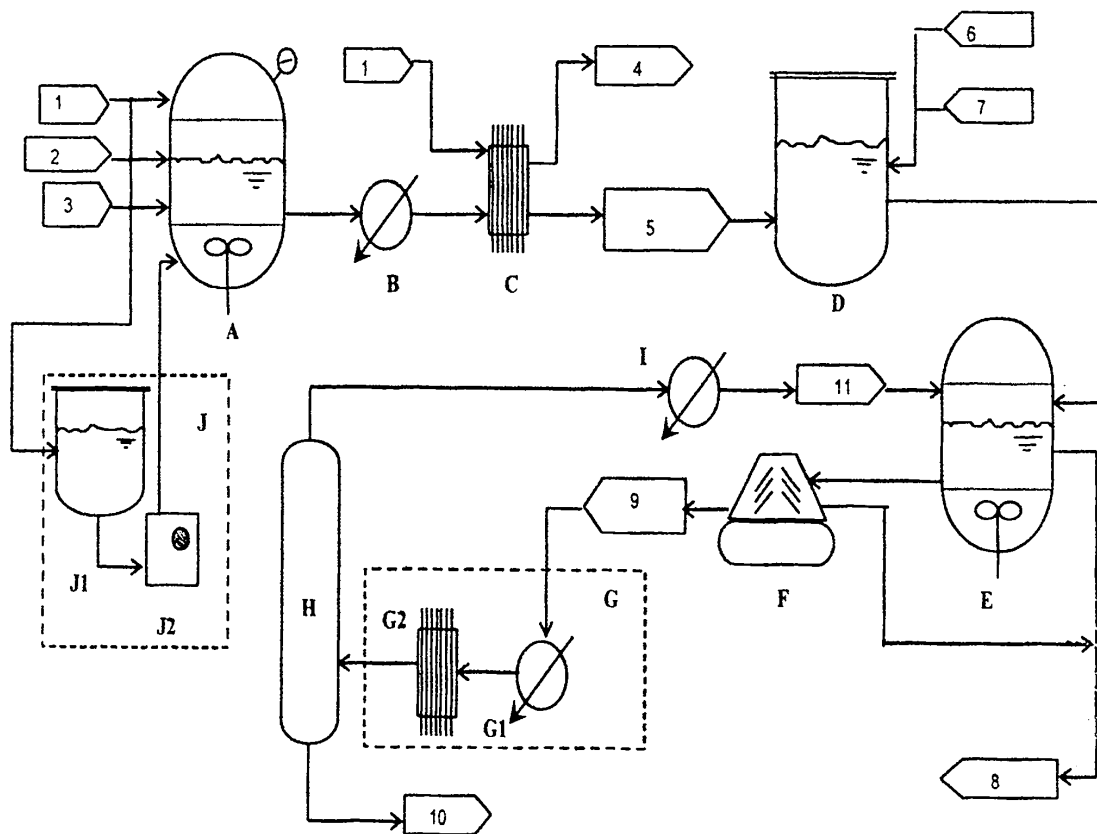


Fig. 1



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 289 898

② Nº de solicitud: 200502741

③ Fecha de presentación de la solicitud: 10.11.2005

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: C11B 1/10 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	LOPEZ-MARTINEZ et al, Ecological and simultaneous seed oil extraction/saponification/gamma-linolenic acid concentration, Eur. J. Lipid Sci. Technol. 107, (3), (11.03.2005), páginas 180-186.	1-17
A	GUIL-GUERRERO et al, Purification process for cod liver oil polyunsaturated fatty acids, Journal of the american oil chemists' society, 78 (5), 2001, páginas 477-484.	1-17
A	LOPEZ-MARTINEZ et al, Gamma-linolenic acid enrichment from Borago officinalis and Echium fastuosum seed oils and fatty acids by low temperature crystallization, Journal of Bioscience and Bioengineering, 97, (5), páginas 294-298, 2004.	1-17

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 nº:

Fecha de realización del informe

28.12.2007

Examinador

M. Ojanguren Fernández

Página

1/1