

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 961 399**

51 Int. Cl.:

C11B 3/12 (2006.01)

A23D 9/013 (2006.01)

C11B 1/02 (2006.01)

A23L 33/115 (2006.01)

A23L 33/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.05.2013** **PCT/FR2013/051186**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.12.2013** **WO13178936**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.05.2013** **E 13731371 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2023** **EP 2854558**

54 Título: **Procedimiento continuo de enriquecimiento en ésteres etílicos de DHA de un aceite producido por microalgas**

30 Prioridad:

29.05.2012 FR 1254942

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.03.2024

73 Titular/es:

ROQUETTE FRÈRES (100.0%)
1 rue de la Haute Loge
62136 Lestrem, FR

72 Inventor/es:

PATINIER, SAMUEL y
LOOTEN, PHILIPPE

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 961 399 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

Procedimiento continuo de enriquecimiento en ésteres etílicos de DHA de un aceite producido por microalgas

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento continuo que permite, de manera industrial, obtener un aceite rico en éster etílico de un ácido graso natural a partir de una microalga: el ácido docosahexaenoico o DHA.

Más particularmente, la presente invención se refiere a la elaboración de un aceite rico en éster etílico de DHA a partir de un aceite procedente de microalgas, que inicialmente:

- 10 - sea moderadamente rico en DHA, y
- presente una alta cantidad de compuestos insaponificables, esencialmente constituidos por escualeno.

- 15 En el sentido de la invención, por “aceite procedente de microalgas”, se entiende un aceite extraído de microalgas de la familia de las *Thraustochytriales sp.*

En el sentido de la invención, por “microalgas de la familia de las *Thraustochytriales sp.*”, se entienden microalgas pertenecientes a las especies *Schizochytrium sp.*, *Aurantiochytrium sp.* y *Thraustochytrium sp.*

- 20 En el sentido de la invención, por aceite “moderadamente rico en DHA”, se entiende un aceite que contenga del 30 al 45 % de DHA en masa de ácidos grasos totales (a modo de simplificación, también se usa el término “peso” de ácidos grasos totales).

- 25 En el sentido de la invención, por “aceite que presente una alta cantidad de compuestos insaponificables, esencialmente constituidos por escualeno”, también se entiende un aceite que contenga del orden del 10 al 30 % en peso de compuestos insaponificables, de ellos del 15 al 25 % siendo de escualeno.

- 30 Finalmente, por “enriquecimiento de un aceite en éster etílico de DHA procedente de microalgas”, se entiende un procedimiento que permita aumentar en un factor de 1,5 a 2 el contenido en DHA del aceite, en este caso, pasar de un contenido inicial en DHA comprendido entre el 30 y el 45 % de DHA en peso de ácidos grasos totales, a un aceite que presente un contenido en ésteres etílicos de DHA comprendido entre el 60 y el 70 % de DHA en peso de ácidos grasos totales.

- 35 Los lípidos constituyen una de las tres grandes familias de macronutrientes, con las proteínas y los glúcidos.

Entre los lípidos, se distinguen concretamente los triglicéridos y los fosfolípidos.

- 40 Los triglicéridos representan aproximadamente el 95 % de los lípidos alimentarios ingeridos. En el organismo están presentes principalmente en los tejidos adiposos, y constituyen la forma principal de almacenamiento de energía.

Los fosfolípidos son lípidos estructurales, ya que son constituyentes de las membranas celulares de las que garantizan, entre otras cosas, la fluidez.

- 45 Los triglicéridos y fosfolípidos se componen principalmente por ácidos grasos que se aportan tanto por la alimentación como, para algunos de ellos, sintetizados por el organismo.

- 50 Las fuentes de alimentación de ácidos grasos poliinsaturados denominados “esenciales”, son los aceites vegetales (principalmente, en ácidos grasos omega 6 y omega 9) y los aceites de pescado, que contienen en particular grandes cantidades de ácidos grasos omega 3.

Los ácidos grasos poliinsaturados se clasifican en función de la posición del primer doble enlace, a partir de la función metilo final.

- 55 Por tanto, en la nomenclatura, para omega “x” o “nx”, “x” corresponde a la posición de la primera insaturación.

La mayoría de los ácidos grasos poliinsaturados de interés biológico pertenecen a la familia de los omega 6 (ácido araquidónico o ARA) u omega 3 (ácido eicosapentaenoico o EPA, ácido docosahexaenoico o DHA).

- 60 Además, en la nomenclatura, también se define el número de carbonos que constituyen la cadena; así, EPA se describe como C20:5, y DHA como C22:6.

Por tanto, el “5” y el “6” corresponden al número de insaturaciones de la cadena carbonada presentes, respectivamente, en EPA y en DHA.

65

DHA, de la familia de los ácidos grasos omega 3, es un ácido graso que el organismo puede sintetizar a partir del ácido alfa-linolénico, o que se aporta por el consumo de pescados grasos (atún, salmón, arenque, ...).

DHA desempeña un papel importante en la estructura de las membranas y en el desarrollo y funcionamiento del cerebro y de la retina.

Los aceites de pescado se usan principalmente como fuente de ácidos grasos de tipo omega 3, tales como DHA y EPA, pero también se encuentran en los aceites de microalgas, de los que se extraen, o bien en mezcla o bien por separado, como es el caso, por ejemplo, de los aceites procedentes de determinadas cepas seleccionadas, tales como las del género *Schizochytrium*, que sólo contienen trazas de EPA, pero grandes contenidos en DHA.

Los métodos convencionales para enriquecer los aceites de pescado en DHA y/o EPA se basan en la selectividad con respecto a la longitud de las cadenas de los ácidos grasos constituyentes de los aceites o su grado de insaturación.

En primer lugar, es necesario proceder a la separación de los ácidos grasos unidos al esqueleto glicérido, con el fin de poder aislar posteriormente las cadenas de DHA y/o de EPA.

Esta operación de separación de los ácidos grasos de la cadena de glicerol se realiza mediante transesterificación etanólica (etanólisis).

Los procesos de enriquecimiento más habitualmente utilizados a continuación, implementados para los ácidos grasos en sí mismos o en sus ésteres, son:

- la cristalización,
- la extracción a contracorriente,
- la destilación molecular, o
- la cromatografía preparativa.

La mayoría de las veces, se combinan diferentes procedimientos con el fin de obtener un gran enriquecimiento.

No obstante, estos procesos tienen los siguientes inconvenientes:

- Los procedimientos de enriquecimiento a alta temperatura dan lugar a degradaciones térmicas de los ácidos grasos (isomerización, peroxidación, oligomerización).
- El inconveniente de las técnicas de cromatografía sigue siendo el uso de cantidades importantes de disolventes, a menudo tóxicos.

Además, la producción a gran escala mediante estas técnicas está lejos de ser sencilla.

Por estos motivos, se han desarrollado y estudiado métodos alternativos, métodos que se basan en el uso de los fluidos supercríticos, concretamente mediante procedimientos de fraccionamiento mediante CO₂ supercrítico.

Una etapa previa al enriquecimiento en DHA y/o EPA de los aceites de pescado mediante CO₂ supercrítico, es la transesterificación de los ácidos grasos, con la ayuda de metanol o de etanol.

El proceso de fraccionamiento de los ésteres etílicos de los ácidos grasos mediante CO₂ supercrítico, por ejemplo, se ha descrito abundantemente en la bibliografía.

Se ha descrito un procedimiento de purificación de ésteres de ácidos grasos poliinsaturados en la solicitud de patente US-2011/0098356, así como en la solicitud internacional PCT/CA2000/000643.

La solicitud internacional PCT/IS2011/050011 describe un procedimiento de separación de los ácidos grasos poliinsaturados de ácidos grasos de cadena larga insaturados o menos saturados.

La solicitud de patente US-20110091947 describe un procedimiento de purificación con alto grado de pureza de ácidos grasos omega-3 altamente insaturados.

La solicitud de patente US-20060286266 describe una concentración de ésteres alquílicos de ácidos grasos producida mediante reacciones enzimáticas con glicerol.

Martân Valverde L y col. han descrito concentraciones de DHA en Journal of the American Oil Chemists' Society, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, vol. 89, n.º 9, 3 de abril de 2012 (03-04-2012), páginas 1633-1645.

Breivik H y col. también han descrito concentraciones de EPA y de DHA en Journal of the American Oil Chemists' Society, SPRINGER, DE, vol. 74, n.º 11, 1 de noviembre de 1997 (01-11-1997), páginas 1425-1429.

5 Los ácidos grasos omega-3 de cadena larga también se han comentado en Breivik H y col.: "Chapter 5 concentrates", 1 de enero de 2007 (01-01-2007), Long-Chain Omega-3 Specialty Oils; página(s) 111-140.

10 La solicitud internacional PCT/US-2012/047730 describe aceites microbianos enriquecidos en ácidos grasos poliinsaturados, y la solicitud de patente US-20110200644 describe emulsiones de éster de DHA.

10 No obstante, conviene observar que la mayoría de los procedimientos citados describen, sobre todo, el enriquecimiento conjunto en ésteres etílicos de EPA y de DHA, y no únicamente de DHA.

15 Por otro lado, la gran mayoría de estos procedimientos:

- son procedimientos discontinuos, por lotes "batch",
- usan cantidades demasiado importantes de fluido supercrítico,
- 20 - tienen un bajo rendimiento,
- y, finalmente, tienen una baja productividad.

25 Por otro lado, la temperatura de 100 °C impuesta en las columnas, en numerosos casos puede provocar la degradación de los ácidos grasos.

Las presiones aplicadas también son demasiado fuertes, y su reducción tiene como consecuencia directa el aumento del consumo de CO₂ supercrítico.

30 Dicho de otro modo, estos procedimientos no pueden usarse a escala industrial en condiciones económicamente viables.

En la solicitud de patente JP 2005-255971, se describe, por ejemplo, un procedimiento de enriquecimiento de aceite de pescado en ésteres etílicos de EPA y de DHA.

35 Los intervalos de temperatura y de presión son, respectivamente, de 35 a 200 °C, y de 100.10⁵ Pa a 500.10⁵ Pa.

Los autores recomiendan dos extracciones sucesivas con vistas a obtener altos contenidos.

40 Se realiza una primera extracción sobre la materia prima, y se realiza una segunda extracción sobre el residuo de la primera operación.

La columna utilizada tiene 3 m de altura para un diámetro de 50 mm. Comprende 6 recintos distintos de calentamiento.

45 Las tasas de disolvente, definidas como la razón del caudal de CO₂ supercrítico con respecto al caudal de aceite tratado, utilizadas para obtener altos porcentajes de DHA, siguen siendo altas.

Estas dos extracciones sucesivas también complican el procedimiento, y hacen que no sea industrialmente aplicable.

50 De la lectura de estos elementos se desprende que se prefiere la elección de la tecnología de enriquecimiento en ácidos grasos de los aceites mediante fluido supercrítico, pero todavía se necesita trabajar en su optimización.

Tal como se mencionó anteriormente, otra fuente de ácidos grasos omega 3 son las microalgas.

55 No obstante, la situación es mucho más compleja en el campo de los aceites de microalgas, ya que se añaden otras dificultades, asociadas a la presencia en los aceites de microalgas de compuestos insaponificables.

60 Es por esto que, aunque la operación de transesterificación habitualmente realizada con los aceites de pescado no supone mayores problemas técnicos, se vuelve problemática para los aceites de microalgas, ya que la transesterificación de los aceites crudos es casi imposible a gran escala desde el punto de vista práctico.

Esta imposibilidad técnica se asocia a la presencia a contenidos variables, pero con frecuencia altos, de compuestos insaponificables, tales como el escualeno.

65 Por consiguiente, se perciben pérdidas importantes de compuestos valiosos.

El escualeno es un hidrocarburo poliinsaturado de interés farmacéutico, cosmético y dietético, presente especialmente en los aceites de microalgas.

Se encuentra en contenidos variables que algunas veces son elevados, superando el 15 % en masa en determinadas cepas seleccionadas, tales como las del género *Schizochytrium*.

En el estado de la técnica, se sabe que puede realizarse la separación del escualeno de los lípidos, constituidos esencialmente por triglicéridos, por ejemplo, mediante destilación molecular, pero a costa de varias etapas sucesivas si se desea extraer el escualeno del aceite y producir un aceite que sólo contenga trazas de escualeno. Arne Pietsch y col. describen la purificación del escualeno a partir de un aceite crudo de pescado, en European Journal Of Lipid Science And Technology, vol. 109, n.º 11, 1 de noviembre de 2007 (01-11-2007), páginas 1077-1082.

Dado que todos los componentes de los aceites de microalgas son particularmente sensibles al calor, este método debe realizarse tradicionalmente a un vacío muy alto, requiriendo instalaciones de volumen muy grande debido a su muy baja productividad.

Por tanto, conviene proponer otras vías:

- más eficaces, si se desea utilizar la destilación molecular, que los procedimientos realizados tradicionalmente, o
- que funcionen a una temperatura moderada, y garanticen la protección de los productos insaturados muy inestables frente a la oxidación por cualquier contacto con el aire, al tiempo que puedan industrializarse fácilmente hasta capacidades de tratamiento de cientos o miles de toneladas de aceite tratadas al año.

Según el conocimiento de la sociedad solicitante, no hay ningún procedimiento eficaz e industrializable de enriquecimiento de aceites en ésteres etílicos de DHA a partir de microalgas, con la ayuda de tecnología de destilación molecular, que sea realmente accesible para el experto en la técnica.

La sociedad solicitante, **interesada en desarrollar un procedimiento eficaz de enriquecimiento de DHA producido por microalgas**, ha desarrollado sus propias investigaciones, y ha logrado adaptar la tecnología de destilación molecular de manera que se garantice un enriquecimiento en DHA de más del doble del contenido del aceite inicial.

Por tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de un aceite enriquecido en ésteres etílicos de DHA, producido mediante fermentación de microorganismos, caracterizado porque comprende una etapa de purificación mediante destilación molecular, denominada de “recorrido corto”.

Los microorganismos son microalgas pertenecientes a la familia de las *Thraustochytriales* sp., preferiblemente microalgas pertenecientes a las especies *Schizochytrium* sp., *Aurantiochytrium* sp. y *Thraustochytrium* sp.

Más precisamente, la presente invención tiene por objeto un procedimiento de preparación de un aceite enriquecido en ésteres etílicos del ácido docosahexaenoico (DHA) producido mediante fermentación de microalgas de la familia de las *Thraustochytriales*, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

- 1) preparar un aceite crudo que contiene una mezcla de triglicéridos ricos en DHA y de compuestos insaponificables compuestos esencialmente por escualeno, a partir de una fermentación de microalgas de la familia de las *Thraustochytriales*,

- 2) opcionalmente, refinar el aceite crudo así obtenido, mediante una sucesión de etapas de desgomado, desacidificación, decoloración y desodorización,

- 3) extraer el escualeno mediante destilación molecular, denominada de “recorrido corto”, de manera que se obtenga un refinado desprovisto del escualeno,

- 4) transesterificar el refinado así obtenido mediante transesterificación alcohólica en presencia de un catalizador básico o enzimático, preferiblemente enzimático,

- 5) fraccionar la mezcla de ésteres de ácidos grasos en la etapa 4) mediante destilación molecular, denominada de “recorrido corto”, de manera que se obtenga un extracto rico en ésteres de ácidos grasos de cadenas cortas y un refinado muy rico en ésteres de ácidos grasos de cadenas largas,

- 6) purificar la mezcla de ésteres de ácidos grasos de cadena larga obtenidos durante la etapa 5) mediante destilación molecular, denominada de “recorrido corto”, de manera que se obtenga un extracto muy rico en ésteres de cadena larga desprovisto de sus impurezas,

- 7) opcionalmente, refinar dicho extracto muy rico en ésteres de cadena larga, mediante una sucesión de etapas de decoloración y desodorización,

8) recoger el aceite enriquecido en ésteres etílicos de DHA así obtenido.

Implementación de la destilación molecular.

En el procedimiento de preparación de un aceite enriquecido en ésteres etílicos de DHA según la invención, se implementa un procedimiento caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

1) preparar un aceite crudo que contiene una mezcla de triglicéridos ricos en DHA y de compuestos insaponificables compuestos esencialmente por escualeno, a partir de una fermentación de microalgas de la familia de las *Thraustochytriales*,

2) opcionalmente, refinar el aceite crudo así obtenido, mediante una sucesión de etapas de desgomado, desacidificación, decoloración y desodorización,

3) extraer el escualeno mediante destilación molecular, denominada de “recorrido corto”, de manera que se obtenga un refinado desprovisto del escualeno,

4) transesterificar el refinado así obtenido mediante transesterificación alcohólica en presencia de un catalizador básico o enzimático, preferiblemente enzimático,

5) fraccionar la mezcla de ésteres de ácidos grasos en la etapa 4) mediante destilación molecular, denominada de “recorrido corto”, de manera que se obtenga un extracto rico en ésteres de ácidos grasos de cadenas cortas y un refinado muy rico en ésteres de ácidos grasos de cadenas largas,

6) purificar la mezcla de ésteres de ácidos grasos de cadena larga obtenidos durante la etapa 5) mediante destilación molecular, denominada de “recorrido corto”, de manera que se obtenga un extracto muy rico en ésteres de cadena larga desprovisto de sus impurezas,

7) opcionalmente, refinar esta fracción extraída muy rica en ésteres de cadena larga mediante una sucesión de etapas de decoloración y desodorización,

8) recoger la composición enriquecida en ésteres etílicos de DHA así obtenida.

La primera etapa de este procedimiento según la invención, consiste en preparar un aceite crudo que contenga una mezcla de triglicéridos ricos en DHA y de compuestos insaponificables compuestos esencialmente por escualeno, a partir de una fermentación de microalgas de la familia de las *Thraustochytriales*.

Como microalgas pertenecientes a la familia de las *Thraustochytriales*, están disponibles, por ejemplo, las siguientes cepas comercializadas:

- *Schizochytrium sp.*, denominada ATCC 20888,

- *Aurantiochytrium sp.*, denominada ATCC PRA 276,

Por otro lado, la sociedad solicitante también dispone de su propia cepa de producción, una *Schizochytrium sp.* depositada el 14 de abril de 2011 en Francia ante la Colección nacional de cultivos de microorganismos del Instituto Pasteur, con el n.º CNCM I-4469, y también depositada en China ante el Centro chino para la colección de cultivos tipo de la Universidad de Wuhan, Wuhan 430072, P.R. China, con el n.º M 209118.

El cultivo se realiza en condiciones heterotróficas. Generalmente, la etapa de cultivo comprende una etapa de precultivo, para verificar la cepa, después una etapa de cultivo o de fermentación propiamente dicha. Esta última etapa corresponde a la etapa de producción de los compuestos lipídicos de interés.

Las condiciones de cultivo de estas microalgas se conocen bien en el campo. A continuación, se trata la biomasa de manera que se obtenga un aceite crudo que contenga una mezcla de DHA y de compuestos insaponificables compuestos esencialmente por escualeno.

Estos tratamientos pueden realizarse mediante cualquier método ya conocido por el experto en la técnica.

Esto permite obtener un aceite crudo constituido por glicéridos (principalmente triglicéridos), compuestos insaponificables (principalmente escualeno) y, posiblemente, por ácidos grasos libres, y por fosfolípidos en proporciones menores. Tal como se mostrará a continuación a modo ilustrativo, el contenido en DHA de entre el 30 y el 45 % en peso de ácidos grasos totales, y de compuestos insaponificables de entre el 10 y el 30 % en peso, de ellos del 15 al 25 % siendo de escualeno, puede obtenerse fácilmente a partir de la cepa CNCM I-4469 descrita anteriormente.

La segunda etapa de este procedimiento según la invención, consiste en, opcionalmente, refinar el aceite crudo así obtenido, mediante una sucesión de etapas de desgomado, desacidificación, decoloración y desodorización.

- 5 Por tanto, el aceite crudo rico en escualeno experimenta previamente un refinado grueso antes de la extracción del escualeno.

Puede preverse una o varias de las siguientes etapas:

- 10 - *Desgomado*: eliminación de los fosfolípidos mediante precipitación en medio ácido,
- *Desacidificación*: neutralización de los ácidos grasos libres empleando una base. Parece que debe descartarse el uso de la destilación molecular para la eliminación de los ácidos grasos libres, con el fin de evitar el arrastre del escualeno,
- 15 - *Decoloración*: mediante tratamiento con carbón activo,
- *Desodorización* (destilación a vacío, arrastre por vapor, ...).

- 20 Estas etapas de refinamiento son etapas habitualmente utilizadas por los especialistas en el campo del refinamiento de aceite vegetal.

La tercera etapa de este procedimiento según la invención, consiste en extraer el escualeno mediante destilación molecular, denominada de “recorrido corto”, de manera que se obtenga un refinado desprovisto del escualeno.

- 25 El escualeno del aceite crudo (o parcialmente purificado) se extrae mediante destilación molecular.

Para un vacío inferior a 0,1 mbar, el punto de ebullición del escualeno es del orden de 200 °C.

- 30 El alto vacío permite limitar la temperatura y, por tanto, limitar los riesgos de degradación/polimerización del escualeno y de los ácidos grasos poliinsaturados.

La sociedad solicitante ha estimado que era importante ajustar el tiempo de permanencia en esta instalación, a una duración muy baja, inferior a un minuto. De manera general, en la presente solicitud, se entiende preferiblemente que el “recorrido corto” se entiende como una puesta en contacto de una duración inferior a 1 minuto.

- 35 Por tanto, a partir del depósito de alimentación inertizado con nitrógeno, se bombea el aceite a través de un primer circuito termostático en un intervalo de 25 a 150 °C hacia el desgasificador (eliminación de las trazas de agua y disolvente).

- 40 En la salida del desgasificador, se bombea el aceite en la cámara de evaporación (denominada “short path”) a través de un circuito termostático en un intervalo de temperatura de 50 a 150 °C, preferiblemente de 100 a 140 °C, en particular de aproximadamente 120 °C.

- 45 La temperatura del evaporador se ajusta en un intervalo de 150 a 250 °C, preferiblemente de 200 a 240 °C, en particular de aproximadamente 220 °C.

El condensador se ajusta en un intervalo de temperatura de 0 a 50 °C, preferiblemente entre 10 y 30 °C, en particular de aproximadamente 20 °C.

- 50 La presión en la cámara de evaporación se ajusta a un alto vacío inferior a 10^{-2} mbar, preferiblemente inferior a 10^{-3} mbar.

El destilado que contiene principalmente el escualeno y el residuo que contiene principalmente los triglicéridos, se dirigen mediante los circuitos de recogida hacia las cubas de almacenamiento inertizadas.

- 55 El contenido de escualeno en el refinado es inferior al 5 %, preferiblemente inferior al 2 %.

La eliminación del escualeno permite obtener una fracción de interés (triglicéridos ricos en DHA) purificada (el refinado) que, entonces, puede entrar en la sucesión de operaciones de enriquecimiento en DHA en forma de ésteres etílicos.

- 60 Este refinado presenta un perfil de ácidos grasos que contiene del orden del 40 % en peso de DHA.

La cuarta etapa de este procedimiento según la invención, consiste en transesterificar el refinado así obtenido, mediante transesterificación alcohólica en presencia de un catalizador básico o enzimático, preferiblemente enzimático.

- 65

Para permitir el enriquecimiento en DHA, es necesario proceder a la separación de los ácidos grasos unidos en el esqueleto glicérico, con el fin de poder aislar posteriormente las cadenas de DHA.

5 Esta operación de separación de los ácidos grasos de la cadena de glicerol, se realiza preferiblemente mediante transesterificación etanólica (etanólisis) enzimática.

Esta conversión se acompaña por una liberación de glicerol.

10 La etanolisis enzimática se realiza en operación "Batch" con la enzima comercial N 435 (*Candida antarctica*) de NOVOZYME, a 50 °C, con etanol en proporción estequiométrica.

En estas condiciones, se obtiene una tasa de conversión superior al 90 % en aproximadamente 8 h de reacción.

15 Al final de la reacción, los ácidos grasos se distribuyen principalmente en la fracción convertida en ésteres etílicos (más del 90 %), permaneciendo el resto en forma de glicéridos residuales (mono, di, triglicéridos).

Antes de proceder al fraccionamiento de los ésteres etílicos, se somete la mezcla de reacción al final de la conversión enzimática a una etapa de filtración, con el fin de extraer la enzima.

20 Se separa el glicerol mediante decantación o centrifugación. También puede lavarse la mezcla con agua, para eliminar el glicerol residual.

Si la concentración residual de etanol es alta, puede eliminarse mediante evaporación al vacío.

25 La quinta etapa de este procedimiento según la invención, consiste en fraccionar la mezcla de ésteres de ácidos grasos obtenida en la etapa 4) mediante destilación molecular, denominada de "recorrido corto", de manera que se obtenga un extracto rico en ésteres de ácidos grasos de cadenas cortas y un refinado muy rico en ésteres de ácidos grasos de cadenas largas.

30 La mezcla de ésteres etílicos obtenidos tal como se describió en la etapa 4, presenta un perfil de ácidos grasos correspondiente al aceite de partida y, por tanto, incluye los ácidos grasos distintos del DHA de interés.

El objetivo de la operación de fraccionamiento es eliminar al máximo los ácidos grasos de cadena más corta (< C 22) que el DHA.

35 La tecnología de destilación empleada para realizar esta operación aprovecha la diferencia de volatilidad de los ésteres etílicos (que depende de su masa molecular y de la longitud de su cadena alifática).

40 Tal como se explicó anteriormente, el alto vacío, así como el tiempo de permanencia muy bajo en esta tecnología (inferior a un minuto), permiten limitar la temperatura y, por tanto, limitar los riesgos de degradación/polimerización de los ácidos grasos poliinsaturados.

Para un vacío inferior a 0,1 mbar, el punto de ebullición de los ésteres etílicos está generalmente en un intervalo de temperaturas inferiores a 250 °C.

45 Esta operación se realiza en realidad en dos etapas:

- la primera etapa de destilación molecular es el fraccionamiento en sí mismo, siendo el objetivo separar la fracción de ésteres etílicos "de cadena corta" para concentrar el residuo en ácidos grasos poliinsaturados,

50 - la segunda etapa es más bien una etapa de purificación, en el sentido en que los ésteres etílicos concentrados en ácidos grasos poliinsaturados se separan de las impurezas pesadas (glicéridos residuales, esteroides, pigmentos, compuestos insaponificables, ...).

55 A partir del depósito de alimentación inertizado con nitrógeno, se envía la mezcla procedente de la etanolisis a través de un primer circuito termostático en un intervalo de 25 a 100 °C hacia el desgasificador (eliminación de las trazas de etanol), por ejemplo, de 70 a 100 °C, concretamente de aproximadamente 100 °C.

60 En la salida del desgasificador, se bombea el aceite en la cámara de evaporación (denominada "short path") a través de un circuito termostático en un intervalo de temperatura de 50 a 100 °C, por ejemplo, de 70 a 90 °C, concretamente de aproximadamente 85 °C.

La presión en la cámara de evaporación se ajusta a un alto vacío inferior a 10^{-2} mbar, preferiblemente inferior a 10^{-3} mbar.

65 El condensador se ajusta en un intervalo de temperatura de 0 a 50 °C, preferiblemente entre 10 y 30 °C, en particular de aproximadamente 20 °C.

La temperatura del evaporador se ajusta en un intervalo de 100 a 200 °C, preferiblemente entre 100 y 150 °C, concretamente de aproximadamente 110 °C.

- 5 La temperatura se ajusta para obtener una razón másica de refinado/destilado correspondiente a la predicción teórica que permita una separación que optimiza la pureza y el rendimiento en ácidos grasos poliinsaturados.

10 El destilado, que contiene principalmente los ésteres etílicos “de cadenas cortas” y el refinado que contiene principalmente los ésteres etílicos “de cadenas largas”, así como las impurezas, se dirigen mediante los circuitos de recogida hacia las cubas de almacenamiento inertizadas.

El contenido en ésteres etílicos de DHA (porcentaje másico) en el refinado es superior al 45 %, preferiblemente superior al 50 %.

- 15 El contenido en DHA en el destilado es inferior al 20 %, preferiblemente inferior al 10 %.

20 La sexta etapa de este procedimiento según la invención, consiste en purificar la mezcla de ésteres de ácidos grasos de cadena larga obtenidos durante la etapa 5) mediante destilación molecular denominada de “recorrido corto”, de manera que se obtenga un extracto muy rico en ésteres de cadena larga desprovisto de sus impurezas.

A partir del depósito de alimentación inertizado con nitrógeno, se envía el refinado obtenido al final de la etapa 5) a través de un primer circuito termorregulado en un intervalo de 25 a 100 °C hacia el desgasificador), por ejemplo, de 70 a 100 °C, concretamente de aproximadamente 100 °C.

- 25 En la salida del desgasificador, se bombea el aceite en la cámara de evaporación (“short path”) a través de un circuito termorregulado en un intervalo de temperatura de 50 a 150 °C, por ejemplo, de 70 a 90 °C, concretamente de aproximadamente 85 °C.

30 La presión en la cámara de evaporación se ajusta a un alto vacío inferior a 10^{-2} mbar, preferiblemente inferior a 10^{-3} mbar.

El condensador se ajusta en un intervalo de temperatura de 0 a 50 °C, preferiblemente entre 10 y 30 °C, en particular de aproximadamente 20 °C.

- 35 La temperatura de la evaporador se ajusta en un intervalo de 100 a 250 °C, preferiblemente entre 180 y 220 °C, concretamente de aproximadamente 200 °C. La temperatura se ajusta para obtener una razón másica de residuo/destilado correspondiente a la predicción teórica que permita una separación eficaz de las impurezas.

40 El destilado, que contiene principalmente los ésteres etílicos “de cadenas largas” purificados y el residuo que contiene las impurezas, se dirige mediante los circuitos de recogida hacia las cubas de almacenamiento inertizadas.

El contenido en ésteres etílicos de DHA (porcentaje másico) en el destilado refinado es superior al 50 %, preferiblemente superior al 55 %.

- 45 El contenido en DHA en el residuo es inferior al 30 %, preferiblemente inferior al 20 %. De este modo, el residuo concentra las impurezas (compuestos insaponificables, glicéridos residuales, pigmentos, ...).

La séptima etapa de este procedimiento según la invención, consiste en, opcionalmente, refinar esta fracción extraída muy rica en ésteres de cadena larga, mediante una sucesión de etapas de decoloración y desodorización.

- 50 Aunque se purifica durante la sexta etapa, el extracto de ésteres etílicos enriquecidos en DHA puede someterse a un refinamiento complementario si es necesario, que consiste en una etapa de decoloración y una etapa de desodorización:

55 - Una etapa de decoloración con el fin de reducir la coloración amarillenta.

Esta etapa de decoloración se realiza sobre tierra decolorante, tal como carbón activo, de manera similar a la decoloración tradicionalmente utilizada en el refinamiento de aceite vegetal.

60 - Una etapa de desodorización, realizada mediante arrastre por vapor al vacío.

La octava etapa de este segundo modo preferible del procedimiento según la invención, consiste finalmente en recoger la composición enriquecida en ésteres etílicos de DHA así obtenida.

- 65 Les ésteres etílicos de DHA así purificados se almacenan bajo atmósfera controlada (de manera ideal, inertizada con nitrógeno).

Una adición de antioxidantes puede resultar favorable para la estabilización de esta fracción.

La presente descripción se refiere, además, al uso de la composición enriquecida en ésteres etílicos de DHA obtenida mediante el procedimiento según la presente invención en los campos alimentarios.

La invención se comprenderá mejor con la ayuda de los siguientes ejemplos, que son meramente ilustrativos y no limitativos.

Ejemplo 1: Preparación de un aceite que contiene entre el 30 y el 45 % de DHA en peso de ácidos grasos totales, y entre el 10 y el 30 % en peso de compuestos insaponificables, de ellos del 15 al 25 % siendo de escualeno a partir de la cepa *Schizochytrium sp* CNCM I-4469

Este ejemplo ilustra el procedimiento de obtención de un aceite crudo que contiene una mezcla de DHA y de compuestos insaponificables, constituida esencialmente por escualeno, producida mediante fermentación de la microalga *Schizochytrium sp.* perteneciente a la sociedad solicitante (depositada el 14 de abril de 2011 en Francia, ante la Colección nacional de cultivos de microorganismo del Instituto Pasteur, con el n.º CNCM I-4469).

En este caso, la fermentación se lleva a cabo en dos fases sucesivas de precultivo antes de la fase de cultivo/producción propiamente dicha en un reactor de 20 l.

Para este experimento, la adición de las vitaminas se garantizó en el primer medio de precultivo, pero fue opcional en el segundo medio de precultivo y en la producción.

Entonces, los medios de precultivo presentaron la composición presentada en las Tablas I y II a continuación:

Tabla I

Medio del primer precultivo	%
Glucosa	3
Extractos de levadura	0,4
Glutamato de sodio	6,42
NaCl	1,25
MgSO ₄	0,4
KCl	0,05
CaCl ₂	0,01
NaHCO ₃	0,05
KH ₂ PO ₄	0,4
Mezcla de vitaminas	0,14
Oligoelementos	0,8

Tabla II

Medio del segundo precultivo	%
Glucosa	8,57
Glutamato de sodio	6,42
Extractos de levadura	0,64
NaCl	2
KH ₂ PO ₄	0,64
MgSO ₄	2,29
CaCl ₂	0,03
NaHCO ₃	0,03

Medio del segundo precultivo	%
Na ₂ SO ₄	0,03
Mezcla de vitaminas	0,14
Oligoelementos	0,2

De manera general, se usó agente antiespumante Clerol "FBA3107" a 1 ml/l. Opcionalmente, se usaron 50 mg/l de "sal de sodio" de penicilina G, con el fin de evitar el crecimiento de bacterias contaminantes.

Se esterilizó la glucosa con KH₂PO₄, y de manera independiente del resto del medio, ya que, de este modo, se evitó la formación de un precipitado (amonio-fosfato-magnesio). La mezcla de las vitaminas y los oligoelementos se añadieron tras esterilización por filtración. La composición del medio de cultivo/producción se facilita en la Tabla III a continuación.

Tabla III

	%
Adición de glucosa a T0	7,5
Urea	1
Extractos de levadura	1,2
NaCl	0,25
KH ₂ PO ₄	0,96
MgSO ₄	1,2
CaCl ₂	0,12
NaHCO ₃	0,12
KCl	0,08
Adición de la mezcla de vitaminas	0,4
Oligoelementos	0,56

La composición de las mezclas de vitaminas y de los oligoelementos se facilita en las Tablas IV y V a continuación:

Tabla IV

Mezcla de vitaminas	g/l
B1	45
B6	45
B12	0,25

Tabla V

Oligoelementos	g/l
MnCl ₂ 2H ₂ O	8,60
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,2
NiSO ₄ 6H ₂ O	7,50
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,15
ZnSO ₄ 7H ₂ O	5,70
CuSO ₄ 5H ₂ O	6,50

Oligoelementos	g/l
FeSO ₄ 7H ₂ O	32,00
ZnCl ₂	1,50

Condiciones de precultivos

El primer precultivo se realizó en matraces Erlenmeyer de 500 ml dotados de deflectores, en los que se añadió una gota de agente antiespumante CLEAROL FBA 3107, comercializado por la sociedad COGNIS GmbH Düsseldorf.

Se filtró el medio de cultivo tras la completa disolución de sus constituyentes, opcionalmente completada con "sal de sodio" de penicilina G, a razón de 0,25 mg/l.

Se realizó la inoculación mediante extracción de colonias de microalgas cultivadas en placas de Petri (a razón de un bucle de 10 µl).

La incubación duró de 24 a 36 horas, a una temperatura de 28 °C, con agitación a 100 rpm (con agitador orbital).

Al decantar la biomasa (o adherirse a la pared), se tuvo mucho cuidado de extraer de 3 a 5 ml, tras haber agitado bien el matraz Erlenmeyer.

Para el segundo precultivo, se usaron matraces Erlenmeyer de 2 l, dotados de deflectores y de tubos.

Se añadió una gota de agente antiespumante y el extracto de levaduras en 100 ml de agua.

Se filtró el conjunto de los constituyentes del medio tras la disolución en 300 ml de agua desmineralizada. Opcionalmente, podía añadirse "sal de sodio" de penicilina G y, de manera previa, en el matraz Erlenmeyer, una gota de agente antiespumante antes de su esterilización.

A continuación, se realizó la siembra con de 3 a 5 ml del primer precultivo.

Se realizó la incubación a 28 °C durante de 24 a 36 horas, con agitación a 100 rpm.

Producción en reactor de 20 l

El cultivo propiamente dicho se realizó de la siguiente manera en un reactor de 20 l.

- esterilización del medio en parte en el reactor y, por separado para la otra parte, para evitar la formación de un precipitado,

- siembra realizada a partir de la biomasa producida al final del segundo precultivo, a razón del 0,5 % v/v del medio de cultivo,

- cultivo mantenido a 30 °C

- tasa de transferencia de oxígeno fijada a 35-40 mmol/l/h,

- aireación de 0,2 a 0,3 VVM,

- pH inicial > 5,5.

- alimentación de la glucosa desde que la concentración sea > 20 %, para mantener una concentración de glucosa comprendida entre 15 y 70 g/l.

La Tabla IV a continuación presenta los resultados obtenidos con la *Schizochytrium sp.* de la sociedad solicitante.

Tabla IV:

Ensayos	E
Temperatura de los precultivos (°C)	28
Temperatura del cultivo (°C)	30
Título de escualeno al final del cultivo (g/l)	4,4

Ensayos	E
Biomasa (g/l)	54
g/100 g de escualeno en biomasa seca	8,2

Recuperación de la biomasa

Se extrajo la biomasa del fermentador, y se lavaron los compuestos solubles intersticiales de la misma mediante sucesión de dos series de concentración por centrifugación (5 minutos a 5000 g) y dilución de la biomasa (a razón de 1/3 Vresiduo/Vagua).

La concentración celular seca en la materia seca bruta total es del 95 %. A continuación, se ajusta la materia seca al 12 %.

Obtención del aceite crudo

Se agita la biomasa lavada en un reactor de laboratorio de tipo fermentador de 2 l (tal como los comercializados por la sociedad Interscience) equipado con una hélice marina y paletas.

Este sistema permite limitar la emulsificación del lisado celular generado, al tiempo que se permite un buen mezclado, indispensable para la acción de la enzima lítica.

Se ajusta la temperatura a 60 °C, y mediante sosa se regula el pH a aproximadamente 8.

Estas condiciones son óptimas para la actividad de la enzima Alcalase (Novozymes) añadida a un nivel del 1 %/s.

Se fija la duración de la lisis a 4 h.

Al final de la lisis, se añade el 10 % de etanol ($V_{\text{etanol}}/V_{\text{lisado}}$) en la mezcla de reacción (emulsión de aceite en agua) mantenida 15 min adicionales con agitación.

Entonces, se obtiene un aceite crudo que contiene del orden del 35 % en peso de DHA y del orden del 15 % en peso de escualeno.

Ejemplo 2: Enriquecimiento de un aceite en ésteres etílicos de DHA mediante destilación molecular

Se usa un aceite de algas *Schizochytrium sp.* producido a partir de algas *Schizochytrium* cultivadas en un fermentador de 1 m³ según condiciones de funcionamiento extrapoladas de las del Ejemplo 1.

La fracción de triglicéridos presenta el siguiente perfil de ácidos grasos:

Nomenclatura	Perfil de ácidos grasos de aceite (% de área con respecto a Agt)**
C14	7,6
C16	20
Osbond	15,3
DHA	40,2
Otros	16,9
Total	100
** porcentaje del compuesto con respecto a la fracción de ácidos grasos totales (distribución de superficie en CG)	

La fracción de compuestos insaponificables está constituida esencialmente por escualeno (~21,8 %/producto crudo).

Etapas 1: Tratamiento del aceite crudo con vistas a eliminar el escualeno

Se usa una unidad de destilación de recorrido corto de tipo Short Path Distillation VTA VK 83-6-SKR-T.

A partir del depósito de alimentación inertizado con nitrógeno, se bombean 8 kg de aceite a 3,5 kg/h hacia el desgasificador, a una temperatura de 120 °C.

En la salida del desgasificador, el aceite atraviesa la cámara de evaporación (“recorrido corto”) a través de un circuito mantenido a 120 °C.

5 La temperatura del evaporador se ajusta a 220 °C.

El condensador se ajusta a una temperatura de 20 °C. El vacío en la cámara de evaporación se fuerza al máximo ($< 10^{-3}$ mbar).

10 El destilado que contiene el escualeno y el residuo que contiene los triglicéridos, se dirigen mediante los circuitos de recogida hacia las cubas de almacenamiento inertizadas.

En esta fase, se recuperan aproximadamente 1,5 kg de destilado y 6 kg de residuo.

15 El contenido de escualeno en el destilado es igual al 94 %.

El contenido de escualeno en el residuo es inferior al 2 %.

Etapa 2: Transesterificación del aceite tratado

20 La transesterificación se lleva a cabo en modo “batch” a partir de los 6 kg de residuo de la etapa 1. Se realiza la reacción a 50 °C en un reactor de doble envuelta, con agitación, cerrado e inertizado con nitrógeno con 600 g de Novozyme 435, 680 g de etanol absoluto.

25 Se mantiene la mezcla de reacción en estas condiciones durante 8 h.

Al final de la reacción, se separa la enzima mediante filtración sobre una malla de nailon de 10 µm. Se centrifuga el filtrado (5 min a 10.000 G) para retirar el glicerol. Se recuperan aproximadamente 6 kg de un aceite cuya fracción de triglicéridos se ha convertido a un nivel del 90 % en ésteres etílicos.

30 La composición es la siguiente:

Nomenclatura	g/100 g de producto crudo*	% de área con respecto a AGt"
35 C14	7	7,7
C16	16,6	18,2
Osbond	12,9	14,5
40 DHA	33,6	38
Otros	19,3	21,6
Total	89,4	100
* porcentaje másico del compuesto en la mezcla en crudo		
** porcentaje del compuesto con respecto a la fracción de ésteres etílicos (distribución de superficie en CG)		

Etapa 3: Fraccionamiento de los ésteres

50 Se usa una unidad de destilación de recorrido corto de tipo Short Path Distillation VTA VK 83-6-SKR-T.

A partir del depósito de alimentación inertizado con nitrógeno, se bombean 6 kg del producto de conversión obtenido en la etapa 2, a 1 kg/h hacia el desgasificador, a una temperatura de 100 °C.

55 En la salida del desgasificador, los ésteres etílicos atraviesan la cámara de evaporación (“recorrido corto”) a través de un circuito mantenido a 85 °C.

La temperatura del evaporador se ajusta a 110 °C.

60 El condensador se ajusta a una temperatura de 20 °C. El vacío en la cámara de evaporación se fuerza al máximo ($< 10^{-3}$ mbar).

65 El destilado que contiene los ésteres etílicos de cadenas cortas (principalmente, C14 y C16) y el residuo que contiene los ésteres etílicos de ácidos grasos de cadenas largas, se dirigen mediante los circuitos de recogida hacia las cubas de almacenamiento inertizadas.

En esta fase, se recuperan aproximadamente 2,6 kg de destilado y 3,6 kg de residuo.

Las composiciones en ésteres etílicos son las siguientes:

Nomenclatura	CARGA		Destilado		Residuo	
	g/100 g de producto crudo*	% de área con respecto a AGt**	g/100 g de producto crudo*	% de área con respecto a AGt**	g/100 g de producto crudo*	% de área con respecto a AGt**
C14	7	7,7	15,9	16,3	0	0
C16	16,6	18,2	40,1	41,2	1,6	1,8
Osbond	12,9	14,5	5,9	6	20,3	22,8
DHA	33,6	38	14,2	14,6	53,9	60,6
Otros	19,3	21,6	21,2	21,9	9,3	14,8
Total	89,4	100	97,3	100	85,1	100
* porcentaje másico del compuesto en la mezcla en crudo						
** porcentaje del compuesto con respecto a la fracción de ésteres etílicos (distribución de superficie en CG)						

El rendimiento en DHA de la separación descrita en esta etapa, es de aproximadamente el 84 % (con respecto a la pérdida de DHA en el destilado).

Etapa 4: Purificación de los ésteres:

Se usa una unidad de destilación de recorrido corto de tipo Short Path Distillation VTA VK 83-6-SKR-T.

A partir del depósito de alimentación inertizado con nitrógeno, se bombean 3,6 kg de ésteres etílicos a 5 kg/h hacia el desgasificador, a una temperatura de 100 °C.

En la salida del desgasificador, los ésteres etílicos atraviesan la cámara de evaporación ("recorrido corto") a través de un circuito mantenido a 85 °C.

La temperatura del evaporador se ajusta a 200 °C.

El condensador se ajusta a una temperatura de 20 °C. El vacío en la cámara de evaporación se fuerza al máximo ($< 10^{-3}$ mbar).

El destilado que contiene los ésteres etílicos de AGPI y el residuo que contiene las impurezas, se dirigen mediante los circuitos de recogida hacia las cubas de almacenamiento inertizadas.

En esta fase, se recuperan aproximadamente 2,9 kg de destilado y 0,4 kg de residuo.

Las composiciones en ésteres etílicos son las siguientes:

Nomenclatura	CARGA		Destilado		Residuo	
	g/100 g de producto crudo*	% de área con respecto a AGt**	g/100 g de producto crudo*	% de área con respecto a AGt**	g/100 g de producto crudo*	% de área con respecto a AGt**
C14	0	0	0	0	0	0
C16	1,6	1,8	1,8	1,8	0,2	1
Osbond	20,3	22,8	22,5	22,9	5,6	24
DHA	53,9	60,6	59,4	60,5	14,8	63,7
Otros	9,3	14,8	10,2	14,8	2,7	11,3
Total	85,1	100	93,9	100	23,3	100
* porcentaje másico del compuesto en la mezcla en crudo						
** porcentaje del compuesto con respecto a la fracción de ésteres etílicos (distribución de superficie en CG)						

El rendimiento en DHA de la separación descrita en esta etapa, es de aproximadamente el 97 % (con respecto a la pérdida de DHA en el destilado).

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de preparación de un aceite enriquecido en ésteres etílicos del ácido docosahexaenoico (DHA) producido mediante fermentación de microalgas de la familia de las *Thraustochytriales*, **caracterizado porque** comprende las siguientes etapas:
 - 1) preparar un aceite crudo que contiene una mezcla de triglicéridos ricos en DHA y de compuestos insaponificables compuestos esencialmente por escualeno, a partir de una fermentación de microalgas de la familia de las *Thraustochytriales*,
 - 2) opcionalmente, refinar el aceite crudo así obtenido, mediante una sucesión de etapas de desgomado, desacidificación, decoloración y desodorización,
 - 3) extraer el escualeno mediante destilación molecular, denominada de “recorrido corto”, de manera que se obtenga un refinado desprovisto del escualeno,
 - 4) transesterificar el refinado así obtenido mediante transesterificación alcohólica en presencia de un catalizador básico o enzimático, preferiblemente enzimático,
 - 5) fraccionar la mezcla de ésteres de ácidos grasos en la etapa 4) mediante destilación molecular, denominada de “recorrido corto”, de manera que se obtenga un extracto rico en ésteres de ácidos grasos de cadenas cortas y un refinado muy rico en ésteres de ácidos grasos de cadenas largas,
 - 6) purificar la mezcla de ésteres de ácidos grasos de cadena larga obtenidos durante la etapa 5) mediante destilación molecular, denominada de “recorrido corto”, de manera que se obtenga un extracto muy rico en ésteres de cadena larga desprovisto de sus impurezas,
 - 7) opcionalmente, refinar dicho extracto muy rico en ésteres de cadena larga, mediante una sucesión de etapas de decoloración y desodorización,
 - 8) recoger el aceite enriquecido en ésteres etílicos de DHA así obtenido.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** las microalgas pertenecientes a la familia de las *Thraustochytriales* *sp* se eligen de las microalgas de las especies *Schizochytrium* *sp.*, *Aurantiochytrium* *sp.* y *Thraustochytrium* *sp.*
3. Procedimiento según las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado porque** las etapas de destilación molecular se realizan a alto vacío, a un valor inferior a 0,1 mbar.
4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** el “recorrido corto” se entiende como una puesta en contacto de una duración inferior a 1 minuto.
5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** la temperatura del evaporador en la etapa 3) se ajusta en un intervalo que va de 200 a 240 °C.
6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** la temperatura del evaporador en la etapa 5) se ajusta en un intervalo que va de 100 a 150 °C.
7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** la temperatura del evaporador en la etapa 6) se ajusta en un intervalo que va de 180 a 220 °C.