



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA NUMERO	102007901489132
Data Deposito	31/01/2007
Data Pubblicazione	31/07/2008

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	P		

Titolo

PROCESSO DI ARRICCHIMENTO ENZIMATICO DI UNA MISCELA CONTENENTE OMEGA 3
--

Descrizione dell'invenzione industriale a nome di Adorkem Technology Spa con sede in Via L. Da Vinci 28 - 24062 Costa Volpino (BG)

La presente invenzione ha per oggetto un procedimento di arricchimento enzimatico selettivo per la preparazione di omega-3 e/o loro esteri; il processo può essere effettuato a partire da miscele di olii naturali dove gli omega-3 sono già presenti sotto forma di esteri.

STATO DELL'ARTE

Con il termine “acidi omega-3” o, più semplicemente “omega-3” si intendono gli acidi grassi poliinsaturi aventi un doppio legame in posizione ω -3; essi hanno normalmente da 18 a 22 atomi di carbonio e da 3 a 6 insaturazioni. Gli omega-3 più comuni sono l'acido α -linolenico (C18:3), l'acido moroetico (C18:4), l'acido eicosatetraenoico (C20:4), l'acido eicosapentaenoico (C20:5; comunemente detto EPA), l'acido eneicosapentaenoico (C21:5), l'acido clupanodonic (C22:5) e l'acido docosaesaenoico (C22:6; comunemente detto DHA).

Gli omega-3 ed i loro esteri, in particolare gli esteri etilici, sono normalmente impiegati nell'industria alimentare ed in quella farmaceutica, in particolare nel trattamento e/o nella prevenzione di malattie e/o eventi cardiovascolari quali ad esempio l'infarto del miocardio.

La miscela comunemente impiegata a tali scopi è definita come esteri etilici di acidi omega-3 90 ed è caratterizzata da (European Pharmacopoeia 5.0):

- un contenuto minimo di etil esteri di EPA e DHA dell'80%, con un minimo del 40% di etil esteri di EPA ed un minimo del 34% di etil esteri di DHA;

- un contenuto minimo di etil esteri di acidi omega-3 del 90%.

La preparazione di omega-3 e dei relativi esteri alchilici è descritta in diversi documenti brevettuali ed è nota in letteratura. Nella domanda di brevetto WO870389 si descrive per esempio un procedimento di purificazione da olio marino mediante frazionamento per cristallizzazione in presenza di urea e successiva distillazione molecolare. Tale procedura consente di ottenere una miscela di acidi grassi con contenuto totale di EPA e DHA pari a circa l'80-90% in peso. Per questa tecnica il contenuto di EPA e DHA nella miscela di partenza costituisce un fattore importante, da controllare, che influisce sulla resa e sulla qualità del processo.

Nel corso degli anni sono stati descritti procedimenti di ottenimento di tali miscele mediante l'ausilio di enzimi. Nella domanda di brevetto WO9626287 si descrive un approccio chemoenzimatico che prevede una reazione di transesterificazione con l'ausilio di lipasi specifiche e non specifiche che consente di ottenere una miscela di trigliceridi ricca per il 60% di acidi grassi poliinsaturi (PUFA) partendo da una miscela che ne contiene solo il 30%. Per l'ottenimento di un buon grado purezza in PUFA sono però necessari passaggi di saponificazione e di cristallizzazione precedenti alla transesterificazione enzimatica.

In WO0073254 è descritto l'utilizzo di una lipasi in grado di dare etanolisi e transesterificazione selettiva in presenza di alcossi alcool su oli di pesce naturale. Tale processo, che utilizza successivi passaggi di distillazione molecolare, consente di isolare miscele ricche di DHA oppure di EPA (pari a circa l'80% in peso), sotto forma di esteri.

EP1300470 e WO2004043894 descrivono l'utilizzo di lipasi in grado di

dare reazioni di arricchimento delle miscele di acidi grassi PUFA.

Le rese ottenibili con i procedimenti sino ad ora descritti sono modeste e difficilmente riproducibili, anche a causa della variabilità della materia prima che induce all'impiego di diversi passaggi di purificazione e di arricchimento.

Inoltre, questi procedimenti presentano lo svantaggio di utilizzare reagenti chimici, con formazioni di impurezze potenziali che possono essere dannose per l'organismo.

DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE

Scopo della presente invenzione è quello di fornire un processo per la preparazione di miscele aventi un elevato contenuto di acidi omega-3 con una tecnica di arricchimento selettiva ottenuta attraverso idrolisi enzimatica che sia esente dagli inconvenienti dei processi della tecnica nota.

Con l'espressione "miscele aventi un elevato contenuto di acidi omega-3" si intendono miscele di acidi grassi e/o loro esteri, aventi un contenuto di esteri degli acidi omega-3, preferibilmente esteri etilici, superiore all'80% in peso; gli esteri sono preferibilmente esteri di alcool C₁-C₄, aventi da 1 a 3 gruppi idrossilici. In particolare, il processo secondo la presente invenzione è finalizzato alla preparazione di miscele conformi alla Farmacopea Europea, ovvero miscele aventi:

- un contenuto minimo di etil esteri di EPA e DHA dell'80%, con un minimo del 40% di etil esteri di EPA ed un minimo del 34% di etil esteri di DHA;
- un contenuto minimo di etil esteri di acidi omega-3 del 90%.

E stato infatti sorprendentemente trovato che utilizzando enzimi specifici

appartenenti alla classe delle lipasi, fino ad ora utilizzate per reazioni di transesterificazione, si è in grado di effettuare una reazione di idrolisi selettiva sui residui esterei di acidi grassi saturi oppure insaturi aventi una catena corta, ovvero inferiore a 18 atomi di carbonio, mantenendo inalterati gli esteri degli acidi grassi a catena superiore, quali ad esempio gli omega 3, che sono poi isolati dal mezzo di reazione per semplice estrazione oppure per distillazione.

La miscela di partenza è preferibilmente composta da miscele naturali di trigliceridi, quali ad esempio olii naturali; possono anche essere utilizzate miscele di trigliceridi in cui gli omega-3, in particolare DHA ed EPA, sono già presenti come esteri etilici. Gli olii naturali possono essere scelti tra olii di pesce, di alghe, di funghi, di microorganismi e/o vegetali. In via preferenziale la reazione è condotta utilizzando miscele che contengono tra il 40 ed il 70% in peso di esteri di EPA ed DHA ed in cui il rapporto EPA/DHA è compreso tra 3 e 0.5, preferibilmente tra 1.5 e 0.9.

La metodologia prevede l'utilizzo di enzimi appartenenti alla classe delle idrolasi, specificatamente alla classe delle lipasi provenienti da diverse fonti microbiche; tra le lipasi preferite vanno segnalate quella da *Pseudomonas Fluorescens*, *Pseudomonas cepacea* e *Candida antarctica*.

Gli enzimi sono preferibilmente utilizzati in forma purificata, sia liberi che immobilizzati su supporto solido o sotto forma di enzima cristallizzato oppure possono essere usati in forma grezza, ad esempio contenuti in paste cellulari o in cellule intere.

Sono utilizzate in particolare immobilizzazioni su supporto solido realizzate mediante metodi ad adsorbimento oppure metodi ad interazione ionica

oppure metodi ad interazione covalente. In via preferenziale sono utilizzate interazioni di tipo covalente mediante l'utilizzo di resine polimeriche funzionalizzate con gruppi epossidici semplici e/o opportunamente derivatizzati e/o stabilizzati.

Secondo la metodologia della presente invenzione, la miscela contenente i trigliceridi, oppure gli esteri etilici degli acidi grassi, oppure la miscela dei due, è posta in ambiente acquoso; al mezzo è aggiunta la lipasi e la reazione è condotta fino a raggiungimento della concentrazione desiderata di omega-3 e, in particolare, di EPA e di DHA. Successivamente gli esteri degli acidi grassi di interesse sono isolati dal mezzo di reazione mediante distillazione oppure separazione chimica oppure cromatografica. Nel caso di miscele di partenza a base di trigliceridi di omega-3, la successiva conversione in esteri etilici può essere effettuata per transesterificazione, secondo metodiche ben note nell'arte.

Il solvente di reazione è acqua, da sola o in miscela con solventi organici ad essa miscibili, in presenza o in assenza di un tampone, il pH essendo preferibilmente compreso tra circa 4 e circa 8 corretto mediante un sale alcalino e/o alcalino terroso. Il solvente è normalmente utilizzato in quantità compresa tra 1 e 50 volumi, preferibilmente tra 1 e 5 volumi, per volume di miscela da trattare.

La bioreazione è normalmente condotta ad una temperatura compresa tra 0 e 100° C e la sua durata è normalmente compresa tra 2 e 96 ore, in funzione della concentrazione di omega-3 che si vuole ottenere. Preferenzialmente è condotta a temperatura compresa tra i 20 e 35°C ed ha una durata compresa tra 5 e 15 ore.

La lipasi è normalmente utilizzata in quantità compresa tra 0.2 e 2.0 parti in peso rispetto alla miscela di esteri etilici di partenza, preferibilmente in quantità compresa tra 0.2 e 1 parti in peso.

Al fine di separare gli esteri dagli acidi idrolizzati, la miscela viene poi sottoposta a estrazione oppure distillazione. In alternativa il prodotto può essere purificato su resine o gel di silice o attraverso tecniche cromatografiche specifiche. La miscela così ottenuta può essere sottoposta a nuovi cicli di arricchimento, a seconda della concentrazione di omega-3 nella miscela di partenza e di quella che si vuole ottenere.

Questo procedimento è molto vantaggioso in quanto permette di aumentare selettivamente il contenuto di DHA e EPA e di ottenere miscele di acidi grassi e/o loro esteri ricche di omega-3, ovvero con un contenuto di omega-3 pari o superiore al 80% in peso della miscela e con un rapporto EPA/DHA compreso tra 0.9 e 1.5.

La tecnica prevede l'utilizzo di un numero limitato di steps di purificazione, cosa che consente una miglioria di rese e qualità del processo. Inoltre utilizzando come solvente di reazione preferibilmente acqua, si migliora l'impatto ecologico e ambientale evitando in questo modo l'utilizzo di solventi.

Gli esempi che seguono hanno scopo puramente illustrativo e non limitativo dell'invenzione.

Esempio 1:

In un reattore da 25 ml si carica 1 g di una miscela di esteri etilici di acidi grassi contenuti EPA e DHA in rapporto 40/20 in peso disciolti in tampone fosfato 1 M pH 7. Si caricano 0.5 g di lipasi da *Pseudomonas Fluorescens* e

si lascia sotto agitazione per 24 ore ad una temperatura di 25 ° C. Il pH è mantenuto costante per aggiunta di NaOH 0.1 N.

Si distilla sotto vuoto e si ottiene in miscela avente un rapporto EPA/DHA pari a 2.5 ed un contenuto di EPA+DHA pari al 74 % in peso.

Esempio 2:

In un reattore da 25 ml si carica 1 g di una miscela di esteri etilici di acidi grassi EPA e DHA in rapporto 40/20 disciolti in tampone fosfato 1 M pH 7.

Si caricano 0.5 g di lipasi da *Pseudomonas cepacea* e si lascia sotto agitazione per 5 ore ad una temperatura di 25° C. Il pH è mantenuto costante per aggiunta di NaOH 0.1 N .

Si distilla sotto vuoto e si ottiene una miscela avente un rapporto EPA/DHA pari a 3.0 ed un contenuto di EPA+DHA pari al 77 % in peso.

Esempio 3:

In un reattore da 25 ml si carica 1 g di una miscela di esteri etilici di acidi grassi EPA e DHA in rapporto 40/20 disciolti in tampone fosfato 1 M pH 7.

Si caricano 0.5 g di lipasi da *Candida antarctica* e si lascia sotto agitazione per 24 ore ad una temperatura di 25° C. Il pH è mantenuto costante per aggiunta di NaOH 0.1 N .

Si distilla sotto vuoto e si ottiene una miscela avente un rapporto EPA/DHA pari a 1.8 ed un contenuto di EPA+DHA pari al 78 % in peso .

Esempio 4:

In un reattore da 25 ml si carica 1 g di una miscela di esteri etilici di acidi grassi EPA e DHA in rapporto 40/20 disciolti in tampone fosfato 1 M pH 7. Si carica 1 g di lipasi da *Candida antarctica* immobilizzato su Eupergit C

e si lascia sotto agitazione per 24 ore ad una temperatura di 25° C. Il pH è mantenuto costante per aggiunta di NaOH 0.1 N .

Si distilla sotto vuoto e si ottiene una miscela avente un rapporto EPA/DHA pari a 1.5 ed un contenuto di EPA+DHA pari all'82 % in peso.

RIVENDICAZIONI

1. Processo per aumentare il contenuto di esteri di acidi omega-3 in una miscela di acidi grassi e/o loro esteri, caratterizzato dal fatto che detta miscela è sottoposta a idrolisi in presenza di una lipasi.
2. Processo secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che detti esteri sono esteri di alcool C₁-C₄, aventi da 1 a 3 gruppi idrossilici.
3. Processo secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che detti esteri sono esteri etilici e/o trigliceridi.
4. Processo secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che detta miscela è un olio naturale oppure una miscela di olii naturali.
5. Processo secondo la rivendicazione 4, caratterizzato dal fatto che detto olio naturale è scelto tra olii di pesce, di alghe, di funghi, di microorganismi e/o vegetali.
6. Processo secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che detta miscela contiene tra il 40 ed il 70% in peso di esteri di EPA ed DHA.
7. Processo secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che il rapporto EPA/DHA in detta miscela è compreso tra 3 e 0.5, preferibilmente tra 1.5 e 0.9.
8. Processo secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che detta lipasi è una lipasi da *Pseudomonas Fluorescens*, *Pseudomonas cepacea* e/o *Candida antartica*.
9. Processo secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che detta idrolisi è effettuata in acqua o in una sua miscela con solventi organici ad essa miscibili.

10. Processo secondo la rivendicazione 9, caratterizzato dal fatto che l'acqua oppure detta sua miscela con solventi organici ad essa miscibili sono in quantità compresa tra 1 e 50 volumi, preferibilmente tra 1 e 5 volumi, per volume di miscela.
11. Processo secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che la lipasi è in quantità compresa tra 0.2 e 2.0 parti in peso rispetto alla miscela, preferibilmente in quantità compresa tra 0.2 e 1 parti in peso.
12. Processo secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che detta idrolisi è effettuata ad una temperatura compresa tra 0 e 100° C, preferibilmente tra 20 e 35°C, e la sua durata è compresa tra 2 e 96 ore, preferibilmente tra 5 e 15 ore.
13. Processo secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che la lipasi è in forma purificata oppure immobilizzata su supporto solido oppure in forma di enzima cristallizzato.
14. Processo secondo la rivendicazione 13, caratterizzato dal fatto che la lipasi è immobilizzata su supporto solido mediante metodi ad adsorbimento, ad interazione ionica oppure ad interazione covalente.
15. Processo secondo la rivendicazione 14, caratterizzato dal fatto che la lipasi è immobilizzata su resine polimeriche.
16. Processo secondo la rivendicazione 15, caratterizzato dal fatto che dette resine polimeriche sono funzionalizzate con gruppi epossidici.
17. Processo secondo le rivendicazioni 1-16, caratterizzato dal fatto che, successivamente all'idrolisi, detta miscela è sottoposta a idrolisi, distillazione, cromatografia e/o purificazione su resine e/o gel di silice.

Il Mandatario

Dott. Roberto Pistolesi

della DRAGOTTI & ASSOCIATI SRL

(Iscr. Albo No.853)

RP/ac