

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 867 549**

51 Int. Cl.:

C12P 7/64 (2006.01)

C11B 1/10 (2006.01)

C12N 1/12 (2006.01)

A61K 36/02 (2006.01)

A61K 8/92 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2009 E 17157189 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.03.2021 EP 3196313**

54 Título: **Extracto de microalgas que contiene ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y método para extraer aceite de microorganismos**

30 Prioridad:

02.10.2008 EP 08165766

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

20.10.2021

73 Titular/es:

**GONZALEZ RAMON, NIEVES (100.0%)
Oude Delft 91C
2611 BD Delft, NL**

72 Inventor/es:

**GONZALEZ RAMON, NIEVES y
WEBER, ANDREAS**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 867 549 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

Extracto de microalgas que contiene ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y método para extraer aceite de microorganismos

5

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

[0001] La invención proporciona un proceso para extraer una fase oleosa a partir de biomasa húmeda de microorganismos, por ejemplo, de biomasa húmeda de microalgas.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] El ácido eicosapentaenoico (EPA, 20: 5n-3) y el ácido docosahexaenoico (DHA, 22: 6n-3) son ácidos grasos ω 3-poliinsaturados que son metabólicamente activos. En una gran cantidad de estudios científicos se han obtenido datos que sugieren que el EPA y/o el DHA son beneficiosos en la prevención y el tratamiento de una variedad de afecciones médicas, incluyendo la cardiopatía coronaria, la agregación plaquetaria, las concentraciones anormales de colesterol, etc.

15

[0003] El EPA y/o el DHA pueden obtenerse del aceite de pescado, por ejemplo, aceite de pescado procedente de hígado de bacalao, sardina arenque, lacha, atún, paparla y lisa. Sin embargo, el precio y la calidad del aceite de pescado varían. Además, existe una preocupación por la contaminación del aceite de pescado con plaguicidas y metales pesados. Por tanto, existe un interés creciente en otra fuente natural de los ácidos grasos ω 3 antes mencionados, a saber, las microalgas.

20

[0004] La extracción de PUFA ω 3 a partir de microalgas plantea un gran desafío. Por lo general, la bioseparación de los PUFA ω 3 de las microalgas implica la eliminación de sustancias insolubles, el aislamiento de productos, la purificación y el refinado. El primer paso en la recuperación posterior de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) a partir de microalgas es la extracción. La extracción debe ser rápida, eficaz y suave para reducir la degradación de los lípidos o ácidos grasos. Como explican Robles Medina y col. (Biotechnology Advances, vol. 16, núm. 3, (1998), 517-580): "Los disolventes de extracción utilizados deben ser económicos, volátiles (para su fácil eliminación más adelante), libres de impurezas tóxicas o reactivas (para evitar la reacción con los lípidos), capaces de formar un sistema de dos fases con agua (para eliminar los no lípidos) y ser malos extractores de componentes no deseados (por ejemplo, proteolípidos, moléculas pequeñas).

25

30

[0005] En la técnica anterior se han descrito varias técnicas de extracción con disolventes para aislar PUFA ω 3 de microalgas. Con frecuencia, la biomasa de microalgas se somete a rotura celular antes de ponerla en contacto con el disolvente de extracción para maximizar la recuperación de productos intracelulares. La rotura celular se puede lograr mediante homogeneización a alta presión, agitación en presencia de perlas de vidrio y cerámica en molinos de perlas, ultrasonidos, lisis química o trituración de biomasa seca. En los procesos comerciales, la biomasa de microalgas liofilizada y deshidratada se suele utilizar como material de partida para el proceso de extracción con disolventes, ya que produce altos rendimientos de extracción.

35

40

[0006] Se sabe en la técnica que el hexano, el cloroformo, el éter dietílico y el etanol pueden extraer PUFA ω 3 tales como EPA y DHA. Los disolventes apolares como el cloroformo, el hexano o el éter dietílico ofrecen la ventaja de que los contaminantes no lipídicos apenas se disuelven en estos disolventes. Sin embargo, estos disolventes apolares no extraen completamente los lípidos polares (por ejemplo, fosfátidos y glucolípidos) debido a su limitada solubilidad en estos disolventes. Con el fin de optimizar los rendimientos de extracción, se han realizado experimentos con una variedad de mezclas de disolventes, por ejemplo, hexano/etanol, hexano-isopropanol y cloroformo/metanol/agua. El etanol es capaz de extraer PUFA ω 3 de microalgas con rendimientos relativamente altos. Sin embargo, el etanol también extraerá agua y una amplia gama de componentes polares. Es por eso que se ha recomendado someter extractos de etanol a otra extracción con disolventes con un disolvente apolar o un paso de aislamiento (por ejemplo, por cromatografía) para separar una fracción enriquecida con lípidos.

45

50

[0007] A.R. Fajardo et al. (Eur. J. Lipid Sci. Tehcnol. 109 (2007) 120-126) describen un método para extraer lípidos de microalgas (*Phyaeodactylum tricorutum*) que comprende los siguientes pasos:

55

- combinación de biomasa liofilizada con etanol y agitación durante 24 horas a temperatura ambiente;
- filtración para producir un extracto crudo;
- adición de agua y hexano al extracto crudo para producir un sistema bifásico; y
- separación del sistema bifásico en una fase hexánica y una fase hidroalcohólica.

60

[0008] Los métodos existentes para aislar PUFA ω 3 de microalgas tienen varios inconvenientes. En primer lugar, la mayoría de estos métodos, si no todos, emplean disolventes apolares como hexano, cloroformo o éter dietílico. La manipulación de estos disolventes presenta un peligro para la seguridad, ya que son altamente explosivos y/o tóxicos. Además, estos disolventes apolares deben eliminarse esencialmente por completo del producto final

65

(PUFA ω 3 que contienen aceite), ya que solo se permiten trazas de estos disolventes en los ingredientes alimentarios.

5 [0009] Otro inconveniente de los métodos de aislamiento existentes reside en su complejidad, en concreto en el número de pasos de aislamiento empleados y/o en la necesidad de derivatizar los lípidos que contienen PUFA ω 3.

[0010] En el documento de patente EP-A 1 178 118 se describe un proceso para obtener un aceite a partir de células microbianas, proceso que comprende los pasos de:

- 10 a) romper las paredes celulares de las células microbianas para liberar el aceite; y
b) separar el aceite de al menos parte de los restos de la pared celular formados en (a).

15 [0011] Los ejemplos de esta solicitud de patente europea describen procesos en los que un hongo (*Mortierella alpina*) y un alga (*Cryptocodinium cohnii*) se rompen por homogeneización a alta presión, seguida de centrifugación que produce una capa superior oleosa y una capa inferior acuosa que contiene los restos celulares.

20 [0012] En la patente WO 93/25644 se describe un método para obtener lípidos con una alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LCP) que tienen de 20 a 22 átomos de carbono mediante extracción de residuos de la producción de alginato o carragenano que han sido sometidos a secado para proporcionar un contenido de agua inferior al 50 % en peso y un tamaño de partícula inferior a 50 μ m, y para la extracción se utiliza un disolvente orgánico o un gas comprimido.

RESUMEN DE LA INVENCION

25 [0013] Los presentes inventores han diseñado un proceso alternativo para aislar PUFA ω 3 de microalgas que evita al menos algunos de los inconvenientes mencionados anteriormente. El proceso según la presente invención parte de biomasa de microalgas húmeda, no requiere el uso de disolventes orgánicos apolares y produce un extracto bifásico que puede procesarse con facilidad más adelante para producir aceite que contiene PUFA ω 3 con alto rendimiento o que puede usarse como tal, por ejemplo, en la producción de pienso para animales. El extracto bifásico obtenido mediante el presente proceso comprende una fase oleosa y una fase acuosa que, juntas, contienen esencialmente todo el material lipídico que estaba contenido originalmente en la biomasa húmeda, es decir, tanto lípidos apolares (por ejemplo, triglicéridos, ácidos grasos libres) como lípidos polares (por ejemplo, glucolípidos, fosfolípidos).

35 [0014] Por lo tanto, la invención se refiere a un proceso de producción de un extracto bifásico como se ha descrito anteriormente a partir de biomasa húmeda de microorganismos que contiene más del 50 % en peso de agua, seguido de la extracción de una fase oleosa, donde dicho proceso comprende:

- 40 – combinar la biomasa húmeda con un disolvente que contenga al menos un 60 % en peso de monoalcohol de C₁₋₅, donde dicha biomasa contiene un 15-95 % en peso de agua y un 5-85 % en peso de materia seca de lípidos seleccionados de entre triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos, fosfátidos, ácidos grasos libres y combinaciones de los mismos;
- 45 – aislar una fase líquida de la combinación de biomasa y disolvente mediante filtración, decantación y/o centrifugación, donde dicha fase líquida contiene un 5-85 % en peso de monoalcohol de C₁₋₅, un 10-85 % en peso de agua y al menos un 5 % en peso de componentes disueltos y/o dispersos provenientes de la biomasa, incluyendo al menos un 5 % en peso de lípidos de monoalcohol de C₁₋₅;
- 50 – reducir la concentración de monoalcohol de C₁₋₅ en fase líquida mediante evaporación a menos del 10 % en peso mientras se mantiene un contenido de agua de al menos un 15 % en peso para producir un extracto que contiene una fase acuosa y una fase oleosa; y
- separar la fase oleosa de la fase acuosa.

55 [0015] El presente proceso ofrece la importante ventaja de que se utiliza biomasa húmeda como material de partida, lo que significa que se pueden evitar los pasos de secado. El secado de biomasa no solo tiene la desventaja de que consume grandes cantidades de energía, sino que también tiene el importante inconveniente de que contribuye a la oxidación de los PUFA ω -3 contenidos en la biomasa.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

60 [0016] El término "extracto bifásico" como se usa en este documento se refiere a un extracto que comprende al menos una fase acuosa y una fase oleosa. Por tanto, el término "extracto bifásico" también abarca emulsiones que comprenden tres o más fases, por ejemplo una emulsión de agua en aceite en agua o una emulsión que contiene otra fase que es inmisible con la fase acuosa o la fase oleosa. Preferiblemente, el extracto bifásico consta esencialmente de dos fases separadas, es decir, la fase acuosa y la fase oleosa.

65 [0017] Siempre que se haga referencia en este documento a una concentración de ácidos grasos, a menos que se indique lo contrario, dicha concentración se calcula en peso respecto de la cantidad total de ácidos grasos,

incluidos los ácidos grasos libres y los ácidos grasos contenidos en los ésteres de ácidos grasos como los ésteres de glicéridos y de fosfatos.

5 [0018] Según una forma de realización particularmente preferida, el extracto de microalgas bifásico comprende del 20 al 90 % en peso de una fase acuosa y del 10 al 80 % en peso de una fase oleosa. De la manera más preferible, el extracto de microalgas bifásico comprende un 30-85 % en peso de una fase acuosa y un 15-70 % en peso de una fase oleosa.

10 [0019] La fase oleosa del presente extracto bifásico contiene preferiblemente un 50-100 %, más preferiblemente un 70-100 % y más preferiblemente un 85-100 % en peso de la fase oleosa de lípidos seleccionados de entre triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos, fosfátidos, ácidos grasos libres y combinaciones de los mismos.

15 [0020] El extracto bifásico normalmente contiene una cantidad considerable de carotenoides, por ejemplo, al menos un 0,03-5 %, más preferiblemente al menos un 0,1 % y de la manera más preferible al menos un 0,3 % de carotenoides en peso de la fase oleosa. Normalmente, la cantidad de carotenoides contenidos en el extracto no excederá el 5 % en peso. Preferiblemente, el contenido de carotenoides no supera el 3 % en peso. Asimismo, el extracto suele contener una cantidad considerable de cloruro de sodio. Normalmente, el extracto bifásico contiene un 0,7-6 %, más preferiblemente un 0,8-4 % de cloruro de sodio en peso de la fase acuosa;

20 [0021] Los beneficios de la presente invención son particularmente pronunciados en caso de que una fracción significativa de los ácidos grasos ω 3 esté contenida en la fracción de lípidos polares, en particular si una fracción significativa está contenida en fosfátidos (por ejemplo, fosfatidilcolina y/o fosfatidiletanolamina) y/o glucolípidos. Según una forma de realización preferida, al menos el 10 % en peso, más preferiblemente al menos el 20 % en peso y de la manera más preferible al menos el 25 % en peso de los ácidos grasos ω 3 están contenidos en lípidos polares seleccionados de entre fosfátidos, glucolípidos y combinaciones de los mismos.

30 [0022] Ventajosamente, el presente extracto contiene un 3-50 %, más preferiblemente un 5-40 % de los lípidos polares antes mencionados en peso de la fase oleosa. Incluso más preferiblemente, el presente extracto contiene un 3-50 %, más preferiblemente un 5-40 % de fosfátidos en peso de la fase oleosa.

35 [0023] Normalmente, el extracto contiene un 0,01-10 %, más preferiblemente un 0,03-10 %, incluso más preferiblemente un 0,1-10 % y de la manera más preferible un 0,1-5 % de monoalcohol de C_{1-5} en peso de la fase acuosa. Preferiblemente, el monoalcohol de C_{1-5} se selecciona del grupo seleccionado entre metanol, etanol, isopropanol y combinaciones de los mismos. Más preferiblemente, el monoalcohol de C_{1-5} es etanol.

40 [0024] Como se ha explicado anteriormente en el presente documento, la presente invención proporciona la importante ventaja de que no se basa en el uso de disolventes orgánicos apolares. Por tanto, según una forma de realización particularmente preferida, el extracto contiene menos del 0,1 % en peso, incluso más preferiblemente menos del 0,03 % en peso de disolventes orgánicos distintos de monoalcohol de C_{1-5} .

45 [0025] Los beneficios de la presente invención pueden realizarse utilizando todo tipo de microalgas, siempre que contengan cantidades significativas de EPA y/o DHA. Según una forma de realización preferida, las microalgas empleadas según la presente invención no son especies secretoras de silicato o calcio pertenecientes a las diatomeas o al género de los Cocolitóforos. Ejemplos de géneros/clases de microalgas que pueden emplearse adecuadamente incluyen *Chysoephyceae*, *Xantophyceae*, *Eustigmatophyceae*, *Baccilariophyceae*, *Dinophyceae*, *Rodophyceae*, *Phaeophyceae*, *Chlorophyceae*, *Prasinophyceae*, *Cryptophyceae*, *Botryococcus*, *Isochrysis*, *Tetraselmis*, *Neochloris*, *Scenedesmus*, *Chlorobotrys*, *Eudosigματοstrum*, *Psetauraciopsis* y combinaciones de los mismos. Incluso más preferiblemente, las microalgas empleadas pertenecen a un género o clase seleccionada de entre *Eustigmatophyceae*, *Chlorophyceae* y combinaciones de los mismos. De la manera más preferible, las microalgas empleadas según la presente invención se seleccionan de entre *Nannochloropsis gaditana*, *Isochrysis galbana*, *Chlorella fusca*, *Haematococcus pluvialis* y combinaciones de las mismas.

50 [0026] Las microalgas empleadas según la presente invención son preferiblemente microalgas verdes. Por consiguiente, en una forma de realización preferida, el extracto contiene al menos un 0,02 %, más preferiblemente un 0,05 % de clorofila en peso de la fase oleosa. Normalmente, la concentración de clorofila del extracto no supera el 1 % en peso de la fase oleosa.

60 [0027] El extracto bifásico de la presente invención se produce mediante la extracción de biomasa húmeda con un monoalcohol de C_{1-5} , seguida de la evaporación de la mayor parte de dicho monoalcohol. Dicho extracto bifásico se caracteriza porque se puede disolver por completo de nuevo en el monoalcohol de C_{1-5} que se había utilizado como disolvente de extracción. Así, según esta forma de realización de la invención, ventajosamente 200 gramos del extracto se pueden disolver completamente en 1 litro de monoalcohol de C_{1-5} .

65 [0028] Preferiblemente, tanto la fase acuosa como la fase oleosa del extracto bifásico contienen menos del 1 % en peso de material no disuelto distinto de las gotitas dispersas de la otra fase. Son deseables niveles bajos de material no disuelto, ya que facilitan la recuperación posterior de los PUFA ω 3 EPA y DHA.

[0029] Normalmente, la fase acuosa y la fase oleosa del presente extracto bifásico juntas representan al menos el 80 % en peso, preferiblemente al menos el 90 % en peso y de la manera más preferible al menos el 98 % en peso del extracto.

5

[0030] Según una forma de realización particularmente preferida, las células contenidas en la biomasa húmeda empleada en el presente proceso no se rompen antes de la combinación de dicha biomasa y el monoalcohol de C₁₋₅. Los inventores han descubierto inesperadamente que no es necesario romper las células de las microalgas (por ejemplo, mediante homogeneización de alto cizallamiento) para lograr altos rendimientos de extracción. Por tanto, según una forma de realización preferida, la biomasa húmeda, cuando se combina con el monoalcohol de C₁₋₅, contiene al menos 10⁸, más preferiblemente al menos 10⁹ y de la manera más preferible al menos 10¹⁰ células de microalgas intactas por gramo de biomasa húmeda.

10

[0031] La fase líquida que se aísla de la combinación de biomasa y disolvente contiene preferiblemente no más del 5 % en peso, más preferiblemente no más del 3 % en peso y de la manera más preferible no más del 2 % en peso de material no disuelto, tal como restos celulares.

15

[0032] Los beneficios del presente proceso son particularmente evidentes en caso de que la biomasa húmeda contenga cantidades considerables de lípidos. Según una forma de realización particularmente preferida, la biomasa húmeda contiene al menos un 10 %, de la manera más preferible al menos un 15 % en peso de materia seca de lípidos seleccionados de entre triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos, fosfátidos, ácidos grasos libres y combinaciones de los mismos.

20

[0033] Además de monoalcohol C₁₋₅, el disolvente utilizado para extraer la biomasa húmeda puede contener otros disolventes como agua y disolventes orgánicos polares. También pueden estar contenidas cantidades menores de disolventes orgánicos apolares en el disolvente de extracción pero, como se ha explicado antes en el presente documento, se prefiere no emplear tales disolventes orgánicos apolares. Aún más preferiblemente, el disolvente de extracción no contiene ningún disolvente orgánico además de monoalcohol de C₁₋₅. Según una forma de realización particularmente preferida, el disolvente de extracción contiene al menos un 80 % en peso, de la manera más preferible al menos un 90 % en peso de monoalcohol de C₁₋₅.

25

30

[0034] Entre los ejemplos de monoalcoholes C₁₋₅ que pueden emplearse adecuadamente en el presente proceso se incluyen metanol, etanol, isopropanol y combinaciones de los mismos. Más preferiblemente, el monoalcohol C₁₋₅ empleado es etanol.

35

[0035] En el presente proceso, la concentración de monoalcohol de C₁₋₅ en fase líquida se reduce mediante evaporación. Dicha evaporación se puede realizar a presión reducida y/o a temperatura elevada.

[0036] El proceso descrito anteriormente es particularmente adecuado para aislar PUFA ω3 a partir de biomasa húmeda de microorganismos. Por consiguiente, dicha biomasa húmeda contiene preferiblemente al menos un 1 %, más preferiblemente al menos un 5 % en peso de ácidos grasos totales de ácidos grasos ω3 seleccionados de entre EPA, DHA y combinaciones de los mismos.

40

[0037] Ventajosamente, la biomasa húmeda empleada en el proceso antes mencionado es una biomasa de microalgas, preferiblemente una biomasa de un género o clase de microalgas seleccionado de entre *Chysophyceae*, *Xantophyceae*, *Eustigmatophyceae*, *Baccilariophyceae*, *Dinophyceae*, *Rodophyceae*, *Phaeophyceae*, *Chlorophyceae*, *Prasinophyceae*, *Cryptophyceae*, *Botryococcus*, *Isochrysis*, *Tetraselmis*, *Neochloris*, *Scenedesmus*, *Chlorobotrys*, *Eudosigματοstrum*, *Psetauraciopsis*, *Psetauraciopsis* y combinaciones de estos. Incluso más preferiblemente, las microalgas empleadas pertenecen a un género o clase de microalgas seleccionadas de entre *Eustigmatophyceae*, *Chlorophyceae* y combinaciones de estos.

45

50

[0038] En el proceso definido anteriormente, la separación de la fase oleosa de la fase acuosa se logra adecuadamente mediante centrifugación y/o decantación. De la manera más preferible, la fase oleosa se separa por decantación.

55

[0039] La biomasa húmeda empleada en este proceso típicamente tiene un contenido de agua de no más del 95 % en peso. Más preferiblemente, la biomasa húmeda empleada en el proceso según la presente invención tiene un contenido de agua de no más del 80 % en peso.

[0040] En el proceso definido anteriormente se produce un extracto bifásico del que se aísla una fase oleosa separándola de una fase acuosa. La separación de la fase oleosa se puede lograr de diferentes formas. Según una forma de realización particularmente preferida, la fase oleosa se separa de la fase acuosa mediante centrifugación y/o decantación. De la manera más preferible, la fase oleosa se separa por decantación. La fase oleosa aislada obtenida mediante el presente proceso puede someterse a pasos de procesamiento adicionales para eliminar impurezas y mejorar la concentración de EPA y/o DHA. En la técnica se conocen técnicas de procesamiento adecuadas para eliminar impurezas y/o para concentrar EPA y/o DHA.

60

65

[0041] Según una forma de realización preferida adicional, la biomasa de algas contiene al menos un 75 % en peso de biomasa de microalgas verdes, preferiblemente al menos un 75 % en peso de biomasa de microalgas pertenecientes a un género de microalgas o clase de microalgas seleccionadas de entre *Chysophyceae*, *Xantophyceae*, *Baccilariophyceae*, *Dinophyceae*, *Rodophyceae*, *Phaeophyceae*, *Chlorophyceae*, *Prasinophyceae*, *Cryptophyceae*, *Botryococcus*, *Isochrysis*, *Tetraselmis*, *Neochloris*, *Scenedesmus*, *Chlorobotrys*, *Eustigmatos*, *Pseudolipidemia*, *Vischerialipistrumdopsis*, *Vischerialipis* y combinaciones de los mismos.

[0042] Ventajosamente, el presente proceso no emplea ningún disolvente orgánico distinto de monoalcohol de C₁₋₅. De la manera más preferible, dicho proceso emplea disolventes orgánicos distintos del etanol.

[0043] El extracto bifásico producido en el proceso mencionado anteriormente es ventajosamente un extracto bifásico como se ha definido antes.

[0044] La invención se ilustra adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos no limitativos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

[0045] Se extrajo biomasa húmeda de microalgas (*Nannochloropsis*) con etanol. La cepa de *nannochloropsis* utilizada fue:

- *Nannochloropsis gaditana* Lubian (1982); División: *Heterokontophyta*, Clase: *Eustigmatophyceae*. CCAP 849/5 de la Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP) Aislador: Lubian (anterior a 1977); Origen: Marino; Bahía de Cádiz, Cádiz, España Cultivo: Medio SNA; A; sub

[0046] Se recolectaron microalgas *Nannochloropsis* en su fase de crecimiento exponencial y la suspensión con las células se centrifugó para eliminar el exceso de agua y sales con una centrífuga de tipo Alfa Laval CLARA 80. Cien gramos de la biomasa húmeda así obtenida se extrajeron con 200 g de etanol puro (al 99,9 %) mediante agitación de la mezcla de biomasa y etanol durante 1 hora a temperatura ambiente utilizando un matraz de Erlenmeyer con agitador magnético y tapón de vidrio. El extracto se filtró por succión con la ayuda de un embudo Büchner y el retenido se lavó dos veces con un total de 50 g de etanol. A continuación, se eliminó más del 99 % en peso del etanol del filtrado usando un evaporador rotatorio (65 °C, 200 mbar). Después de la evaporación, se dejó enfriar el extracto a temperatura ambiente. En este paso se produjo la separación de fases, que dio un extracto bifásico que comprendía:

- un 73 % en peso de una fase inferior acuosa que contenía principalmente sales y componentes glucídicos; y
- un 27 % en peso de una fase superior oleosa con un punto de fusión de aproximadamente 30 °C.

[0047] La fase oleosa se separó de la fase acuosa mediante decantación. La cantidad total de material extraído representó el 32 % en peso de la biomasa original (materia seca). El análisis mostró que la fase superior lipídica contenía un 5,5 % en peso de ácido eicosapentaenoico (EPA).

[0048] El análisis por cromatografía de gases (CG) mostró además que el ácido palmítico, el ácido esteárico y el ácido oleico eran los principales ácidos grasos, que, juntos, representaban el 60-70 % en peso de los ácidos grasos contenidos en la fase oleosa.

[0049] Una muestra de la fase oleosa aislada se sometió a análisis de lípidos utilizando una columna de vidrio que contenía 3 g de gel de sílice 60 en 5 ml de cloroformo. Para ello se aplicaron a la columna 0,1030 g de la fase oleosa en 2-3 ml de cloroformo, seguido de elución con:

- 100 ml de cloroformo para eluir los LÍPIDOS NEUTROS (esteroles, triglicéridos, ácidos grasos);
- 150 ml de acetona: metanol (9:1) para eluir los GLUCOLÍPIDOS (cerebrósidos, sulfátidos, mono y digalactosil diglicéridos, glucósidos de esterol) y las CERAMIDAS, y finalmente
- 100 ml de metanol para eluir los fosfolípidos.

[0050] Se observó que la composición de la fase oleosa era la siguiente:

LÍPIDOS NEUTROS	47,05 % en peso
GLUCOLÍPIDOS Y CERAMIDAS	26,22 % en peso
FOSFOLÍPIDOS	26,73 % en peso

[0051] Además, se observó que la fase oleosa contenía un 2,71 % en peso de colesterol y 1285 mg/kg de caroteno.

Ejemplo 2

[0052] El retenido obtenido del embudo Büchner después de la extracción descrita en el Ejemplo 1 se sometió a otra extracción con 200 g de etanol puro (al 99,9 %) a temperatura ambiente agitando la mezcla de extracción durante 1 hora en un matraz de Erlenmeyer con agitador magnético y tapón de vidrio. El extracto se filtró por succión con la ayuda de un embudo Büchner y el retenido se lavó dos veces con un total de 50 g de etanol. A continuación, se eliminó el etanol del filtrado usando un rotavapor (65 °C, 200 mbar) y se dejó enfriar a temperatura ambiente, con lo que se obtuvo un extracto oleoso.

[0053] La cantidad total de material extraído durante la segunda extracción representó el 5,9 % en peso de la biomasa original. El análisis mostró además que el extracto obtenido en la segunda extracción contenía 5,1 % en peso de EPA. El análisis por CG mostró además que la composición de ácidos grasos del segundo extracto era esencialmente idéntica a la del primer extracto.

[0054] El retenido de la segunda extracción se extrajo dos veces con una mezcla de cloroformo y metanol para eliminar cualquier material lipídico residual contenido en el mismo. La cantidad total de lípidos extraídos con esta mezcla de disolventes fue del 4,3 % en peso de la masa extraída. El contenido de EPA de los lípidos extraídos fue del 1,7 % en peso. La cantidad total de EPA eliminada de la biomasa húmeda mediante las dos extracciones con etanol y la extracción con cloroformo/metanol fue del 13,4 % en peso de materia seca. Este porcentaje es igual a la cantidad de EPA que se encuentra normalmente en *Nannocloropsis*.

[0055] Las muestras tanto del extracto obtenido de la primera extracción descrita en el Ejemplo 1 como del extracto obtenido de la segunda extracción se sometieron a cromatografía en capa fina. Los cromatogramas obtenidos de este modo mostraron que el primer extracto constaba principalmente de lípidos polares, glucofosfolípidos y fosfolípidos y que el segundo extracto constaba principalmente de triglicéridos y componentes con color (clorofilas).

Ejemplo 3

[0056] Los ejemplos 1 y 2 se repitieron usando un lote diferente de biomasa húmeda de *Nannocloropsis*. Se observó que la primera extracción eliminó el 31,3 % en peso del material extraído de la biomasa original (calculado sobre la materia seca), mientras que la segunda extracción eliminó otro 7,3 % en peso

[0057] De nuevo, la primera extracción produjo un extracto bifásico que se separó en una fase oleosa y una fase acuosa por decantación. La fase oleosa de la primera extracción contenía un 7,3 % en peso de EPA y el extracto obtenido de la segunda extracción contenía un 4,4 % en peso de EPA.

Ejemplo comparativo A

[0058] La misma cepa de *Nannocloropsis* que se usó en los Ejemplos 1-3 se homogeneizó y se secó mediante secado por pulverización. Posteriormente, 250 g de la biomasa seca se sometieron a extracción con dióxido de carbono supercrítico (caudal constante de 5-5,5 kg/h). Durante la extracción, el dióxido de carbono supercrítico se recirculó continuamente. Los componentes extraídos se eliminaron expandiendo el dióxido de carbono en una cámara de expansión seguido de (re)presurización del dióxido de carbono a un estado supercrítico. Primero, la biomasa seca se extrajo con dióxido de carbono supercrítico (300 bar, 90 °C). A continuación, el residuo de extracción se extrajo una vez más con dióxido de carbono supercrítico (150 bar, 50 °C seguido de 300 bar, 90 °C)

[0059] En la Tabla 1 se resumen las condiciones de extracción y los rendimientos de extracción:

Tabla 1

Condiciones de extracción	Cantidad total extraída (en masa seca)	EPA en el aceite extraído
300 bar, 90 °C, 18 h	23 % en peso	3,3 % en peso
a) 150 bar, 50 °C, 5,5 h b) 300 bar, 90 °C, 5,5 h	14 % en peso	a) 3,2 % en peso b) 2,8 % en peso

[0060] Los niveles de EPA en el aceite extraído fueron significativamente más bajos que los hallados en los aceites extraídos de los Ejemplos 1-3. Se observó además que el residuo obtenido de la segunda extracción todavía contenía una cantidad sustancial de EPA (13-16 % del EPA contenido en el material de partida), a pesar de los largos tiempos de extracción empleados.

Ejemplo comparativo B

[0061] Dos lotes de la misma cepa de *Nannocloropsis* que se usó en los Ejemplos 1-3 se homogeneizaron y se secaron mediante secado por pulverización. Posteriormente, la biomasa seca se extrajo a temperatura ambiente con una mezcla de cloroformo y metanol utilizando un método de Blight and Dyer modificado. La biomasa húmeda (20 gramos) se mezcló con una mezcla 1:2 (p/p) de cloroformo/metanol (75 ml) en un matraz de Erlenmeyer y se

agitó vigorosamente durante 3 minutos. A continuación, se agregaron 20 ml de cloroformo y 20 ml de agua, seguido de 3 horas de agitación. La mezcla se transfirió a un decantador en el que se dejó que ocurriera la separación de fases durante un periodo de dos horas. Se recuperó la fase inferior (clorofórmica) y se eliminó el disolvente orgánico usando un rotavapor. La Tabla 2 resume los rendimientos de extracción así obtenidos para cada lote de *Nannocloropsis*:

5

Tabla 2

Cantidad total extraída (en masa seca)	EPA en el aceite extraído
24,6 % en peso	6,0 % en peso
20,0 % en peso	3,2 % en peso

[0062] La extracción con la mezcla de cloroformo/metanol produce altos rendimientos de EPA. Sin embargo, dado que tanto el cloroformo como el metanol son tóxicos, se deben tomar precauciones de seguridad estrictas durante la extracción y se requiere un procesamiento posterior complejo para reducir los niveles de disolvente residual a niveles que se consideran de calidad alimentaria.

10

Ejemplo comparativo C

15

[0063] Dos lotes de la misma cepa de *Nannocloropsis* que se usó en los Ejemplos 1-3 se homogeneizaron y se secaron mediante secado por pulverización. Posteriormente, la biomasa seca (15 g) se sometió a extracción con 300 ml de hexano en un extractor Soxhlet a 80 °C durante 12 horas. La Tabla 3 resume los rendimientos de extracción así obtenidos para cada lote de *Nannocloropsis*:

20

Tabla 3

Cantidad total extraída (en masa seca)	EPA en el aceite extraído
25,4 % en peso	3,9 % en peso
23,2 % en peso	3,9 % en peso

[0064] La extracción con hexano produjo un rendimiento de lípidos muy alto, pero el nivel de EPA en los aceites extraídos fue considerablemente más bajo que el hallado en los aceites extraídos de los Ejemplos 1-3. Además, se observó que una alta proporción de EPA se retuvo en el residuo de extracción (aproximadamente 20 %), a pesar de los largos tiempos de extracción empleados.

25

Ejemplo 4

30

[0065] Se repitió el Ejemplo 1, excepto en que esta vez se extrajo biomasa de microalgas de *Chorella fusca* (División: *Scenedesmus*, origen: agua dulce) con etanol. La biomasa de microalgas utilizada (de Source Ingrepro BV, Países Bajos) se suministró en forma seca y se reconstituyó con agua de mar (1:1) antes de la extracción. Según la especificación, la biomasa seca tiene un contenido de lípidos del 6-20 %, dependiendo de la temporada de cosecha.

35

[0066] Tras la evaporación en rotavapor y posterior enfriamiento a temperatura ambiente, se obtuvo un extracto bifásico que contenía un 26 % en peso de fase oleosa y un 74 % en peso de fase acuosa. Se observó que la extracción eliminó el 26,4 % en peso del material extraído de la biomasa original (calculado sobre la materia seca).

40

[0067] El análisis por CG mostró que el ácido palmítico, el ácido esteárico y el ácido oleico eran los principales ácidos grasos, que, juntos, representaban el 60-70 % en peso de los ácidos grasos contenidos en la fase oleosa. Una muestra de la fase oleosa aislada se sometió al mismo análisis de lípidos que se describe en el Ejemplo 1.

45

[0068] Se observó que la composición de la fase oleosa era la siguiente:

LÍPIDOS NEUTROS	47 % en peso
GLUCOLÍPIDOS Y CERAMIDAS	26 % en peso
FOSFOLÍPIDOS	27 % en peso

Ejemplo 5

50

[0069] Se repitió el ejemplo 4, excepto en que esta vez en lugar de etanol puro se usó una mezcla 9:1 de etanol y hexano. Tras la evaporación en rotavapor y posterior enfriamiento a temperatura ambiente, se obtuvo un extracto bifásico que contenía un 31 % en peso de fase oleosa y un 69 % en peso de fase acuosa. Se observó que la extracción eliminó el 27,4 % en peso del material extraído de la biomasa original (calculado sobre la materia seca).

Ejemplo 6

[0070] La cepa de *Nannochloropsis* de los Ejemplos 1-3 se sometió a un proceso de extracción de aceite alternativo que implicaba un tratamiento enzimático de la biomasa húmeda. Se recolectaron microalgas *Nannochloropsis* en su fase de crecimiento exponencial y se centrifugó la suspensión de células para la eliminación del exceso de agua y sales con una centrifugadora de tipo Alfa Laval CLARA 80. Se introdujeron cien gramos de la biomasa húmeda obtenida de este modo en un matraz de Erlenmeyer y el pH se ajustó a 4,5 con tampón de acetato. A continuación, se añadió una preparación enzimática y se mezcló minuciosamente con la biomasa. La mezcla resultante se mantuvo a 50 °C con la ayuda de un baño de agua y agitación suave. Las suspensiones celulares obtenidas de este modo se filtraron sobre papel de filtro Waltman® estándar para eliminar los restos celulares y posteriormente se sometieron a centrifugación suave (10 minutos a 2000 G). En todos los casos, la centrifugación produjo un extracto bifásico que contenía una fase acuosa y una fase oleosa.

[0071] La Tabla 4 especifica las preparaciones enzimáticas y las condiciones que se utilizaron, así como el contenido de EPA de la fase oleosa:

Tabla 4

Enzima digestiva	Cantidad de enzima agregada	Condiciones	EPA en fase oleosa
Accelerase® 1000	0,05 ml por gramo de biomasa	1 hora a 50 °C	6,2 %
Accelerase® 1000	0,05 ml por gramo de biomasa	5 horas a 50 °C	6,3 %
Viscozyme® L	1 % en peso de biomasa seca	6 horas a 50 °C	7,3 %
Celluclast® BG	1 % en peso de biomasa seca	6 horas a 50 °C	7,4 %
Viscozyme® L + Celluclast® BG	1 % en peso de biomasa seca	6 horas a 50 °C	8,9 %

Ejemplo 7

[0072] La biomasa de las siguientes especies de microalgas se extrajo con etanol:

- *Nannochloropsis gaditana* Lubian (1982); División: *Heterokontophyta*, Clase: *Eustigmatophyceae*. CCAP 849/5 de la Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP). Aislador: Lubian (antes de 1977). Origen: Marino; Bahía de Cádiz, Cádiz, España. Cultivo: Medio SNA; A; sub
- *Chlorella fusca*. Fuente Ingrepro BV, Países Bajos, Contenido medio de lípidos: 6-20 % según la temporada de cosecha. División: *Scenedesmus*. Origen: agua dulce
- *Haematococcus pluvialis* Flotow (1844), División: *Chlorophyta*, Clase: *Chlorophyceae*, Orden: *Volvocales*. CCAP 34/6 de la Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP). Aislador: Droop (1951). Origen: agua dulce, charco de agua de lluvia; Isla de Ostpicken, Tvarmimme, Finlandia. Cultivo: Medio EG: JM; A; crio
- *Isochrysis galbana* Parke (1949), División: *Prymnesiophyta (Haptophyta)*, Clase: *Prymnesiophyciae*. CCAP 927/1 de la Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP). Aislador: Parke (1938); Origen: Marino; estanque de peces; Estación Marina de Port Erin, Isla de Man, Gran Bretaña. Cultivo: Medio f/2; A; sub

[0073] Las microalgas se recolectaron en su fase de crecimiento exponencial y la suspensión de células se centrifugó para la eliminación del exceso de agua y sales con una centrífuga de tipo Alfa Laval CLARA 80. Para las especies no marinas se ajustó el contenido de sal para lograr la misma concentración de sal que el agua de mar. Las suspensiones celulares obtenidas de este modo se sometieron a secado en tambor para producir una biomasa de microalgas con un contenido de humedad de aproximadamente el 50 %.

[0074] Para cada especie de microalga se extrajeron cien gramos de biomasa secada en tambor con 200 g de etanol puro (99,9 %) agitando la mezcla de biomasa y etanol durante 1 hora a temperatura ambiente utilizando un matraz de Erlenmeyer con agitador magnético y tapón de vidrio. Los extractos obtenidos de esta manera se filtraron por succión con ayuda de un embudo Büchner y los retenidos se lavaron dos veces con un total de 50 g de etanol. A continuación, se eliminó más del 99 % en peso del etanol de los filtrados usando un rotavapor (65°C, 200 mbar).

[0075] Después de la evaporación, los extractos se dejaron enfriar a temperatura ambiente. En este paso se produjo la separación de fases en todas las muestras, con lo que se obtuvo un extracto bifásico que comprendía: una fase inferior acuosa que contenía principalmente sales y componentes glicídicos; y una fase superior oleosa con un punto de fusión de aproximadamente 30 °C.

[0076] Las fases oleosas se separaron de las acuosas mediante decantación. Los análisis de estas fases oleosas dieron los siguientes datos:

ES 2 867 549 T3

Microalgas	Lípidos #	Ácido eicosapentaenoico (EPA) o docosahexaenoico (DHA)	Carotenoides
<i>Isochrysis galbana</i>	48,5 % en peso	1 % en peso (DHA)	1,88 % en peso
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	82,3 % en peso	5,6 % en peso (EPA)	4,1 % en peso
<i>Chlorella fusca</i>	97,5 % en peso	1,5 % en peso (EPA)	1,3 % en peso
<i>Haematococcus pluvialis</i>	96,6 % en peso	1,4 % en peso (EPA)	5 % en peso
# Lípidos = triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos, fosfátidos, ácidos grasos libres			

REIVINDICACIONES

1. Proceso de extracción de una fase oleosa a partir de biomasa húmeda de microorganismos que contiene más del 50 % en peso de agua, proceso que comprende:

- combinar la biomasa húmeda con un disolvente que contenga al menos un 60 % en peso de monoalcohol de C₁₋₅, donde dicha biomasa contiene un 15-95 % en peso de agua y un 5-85 % en peso de materia seca de lípidos seleccionados de entre triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos, fosfátidos, ácidos grasos libres y combinaciones de los mismos;
- aislar una fase líquida de la combinación de biomasa y disolvente mediante filtración, decantación y/o centrifugación, donde dicha fase líquida contiene un 5-85 % en peso de monoalcohol de C₁₋₅, un 10-85 % en peso de agua y al menos un 5 % en peso de componentes disueltos y/o dispersos provenientes de la biomasa, incluyendo al menos un 5 % de lípidos en peso de monoalcohol de C₁₋₅;
- reducir la concentración de monoalcohol de C₁₋₅ en fase líquida mediante evaporación a menos del 10 % en peso mientras se mantiene un contenido de agua de al menos un 15 % en peso para producir un extracto bifásico que contiene una fase acuosa y una fase oleosa; y
- separar la fase oleosa de la fase acuosa.

2. Proceso según la reivindicación 1, en el que la biomasa húmeda contiene al menos un 10 % en peso de materia seca de lípidos seleccionados de entre triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos, fosfátidos, ácidos grasos libres y combinaciones de los mismos.

3. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 2, en el que las células contenidas en la biomasa húmeda no se rompen antes de la combinación de dicha biomasa y el monoalcohol de C₁₋₅.

4. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en el que el monoalcohol de C₁₋₅ se elige del grupo que consiste en metanol, etanol, isopropanol y combinaciones de los mismos.

5. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, en el que la biomasa húmeda contiene al menos un 1 % en peso de ácidos grasos totales de ácidos grasos ω 3 seleccionados de entre EPA, DHA y combinaciones de los mismos.

6. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, en el que la fase líquida que se separa de la combinación de biomasa húmeda y disolvente contiene no más del 5 % en peso de material no disuelto.

7. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6, en el que el proceso no emplea ningún disolvente orgánico distinto de monoalcohol de C₁₋₅.

8. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la biomasa húmeda es una biomasa de microalgas, preferiblemente una biomasa de un género o clase de microalgas seleccionado de entre *Chysophyceae*, *Xantophyceae*, *Eustigmatophyceae*, *Baccilariophyceae*, *Dinophyceae*, *Rodophyceae*, *Phaeophyceae*, *Chlorophyceae*, *Prasinophyceae*, *Cryptophyceae*, *Botryococcus*, *Isochrysis*, *Tetraselmis*, *Neochloris*, *Scenedesmus*, *Chlorobotrys*, *Eudosigmatostrum*, *Psetauraciopsis*, *Psetauraciopsis* y combinaciones de estos.

9. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 8, en el que la fase oleosa se separa de la fase acuosa mediante centrifugación o decantación.

10. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 9, en el que la biomasa húmeda es una biomasa de microalgas y el extracto bifásico producido en dicho proceso es un extracto de microalgas bifásico que comprende un 15-95 % en peso de una fase acuosa y un 5-85 % en peso de una fase oleosa, donde dicho extracto contiene al menos un 1 % en peso de ácidos grasos totales de ácidos grasos ω 3 seleccionados del grupo que consiste en ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA) y combinaciones de los mismos, donde dicho extracto además está **caracterizado por el hecho de que** contiene:

- un 40-100 % en peso de la fase oleosa de lípidos seleccionados de entre triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos, fosfátidos, ácidos grasos libres y combinaciones de los mismos;
- un 0,01-10 % de carotenoides en peso de la fase oleosa;
- un 0,5-10 % de cloruro de sodio en peso de la fase acuosa;
- un 0-3 % en peso de material no disuelto que no sean gotículas dispersas de fase acuosa o fase oleosa; y
- un 0-10 % de monoalcohol de C₁₋₅ en peso de la fase acuosa.

11. Proceso según la reivindicación 10, en el que al menos el 10 % en peso de los ácidos grasos ω 3 del extracto bifásico están contenidos en lípidos polares seleccionados de entre fosfátidos, glucolípidos y combinaciones de los mismos.
- 5 12. Proceso según la reivindicación 10 u 11, en el que el extracto bifásico contiene un 0,01-10 % de monoalcohol de C₁₋₅ en peso de la fase acuosa.