



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ N.º de publicación: **ES 2 093 570**

⑫ Número de solicitud: 9501209

⑬ Int. Cl.⁶: C11C 1/04, C11C 3/02

C11C 1/10, C11B 7/00

C12P 7/64, C07D 311/72

C12S 3/00

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **15.06.95**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **16.12.96**

Fecha de concesión: **23.05.97**

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **01.07.97**

⑱ Fecha de publicación del folleto de patente:
01.07.97

⑲ Titular/es: **Domingo Saura López**
Plaza Santoria, Edf. Constanza, 3-6º C
Murcia, ES

⑳ Inventor/es: **Saura López, Domingo**

㉑ Agente: **Ungría López, Javier**

㉒ Título: **Procedimiento para la preparación enzimática de extractos oleosos enriquecidos en antioxidantes naturales.**

㉓ Resumen:

Procedimiento para la preparación enzimática de extractos oleosos enriquecidos en antioxidantes naturales.

Comprende: (a) someter a una reacción enzimática un desodorizado de aceites animales o vegetales previamente sometido a una destilación a vacío; (b) someter el producto obtenido a una destilación en dos etapas, la primera a 200-240 °C y la segunda a 210-280 °C; (c) tratar la fracción de destilación rica en antioxidantes seguido de filtración, centrifugación y destilación.

Aplicación en la industria alimenticia humana y animal.

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

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 - 28036 Madrid

ES 2 093 570 B1

DESCRIPCION

Procedimiento para la preparación enzimática de extractos oleosos enriquecidos en antioxidantes naturales.

Campo técnico de la invención

La presente invención se encuadra dentro del campo de los aceites destinados a la alimentación humana y animal.

De modo más concreto, la presente invención se refiere a un procedimiento de tipo enzimático para la obtención de extractos oleosos enriquecidos en antioxidantes naturales, en especial tocoferol.

Estado de la técnica anterior a la invención

El número de antioxidantes utilizados en la industria es de una enorme amplitud. Se han recogido más de 150 de acuerdo a su estructura química y forma de actuación (eliminadores de radicales, de oxígeno, de peróxidos o que actúa como filtro UV.)

La lista de los permitidos en alimentación es mucho más corta y está sujeta a recientes modificaciones en las que los antioxidantes fenólicos son el principal objeto de especulación. La legislación de la mayoría de los países los regula estrechamente, por medio de las llamadas listas positivas. Tales listas se basan habitualmente, por una parte, en consideraciones sanitarias y datos toxicológicos y, por otra, en las necesidades de la industria alimenticia tanto animal como humana. La intención es mantener el número de antioxidantes tan bajo como sea posible. En la mayoría de los países (CEE, USA, JAPON, etc.) estos antioxidantes han de ser declarados en etiqueta. Consecuentemente los fabricantes prefieren aquellos antioxidantes que son más fácilmente aceptables por los consumidores, cada vez más críticos.

Los antioxidantes naturales comercialmente viables más importantes son el tocoferol y el ácido ascórbico. Además ciertos extractos vegetales de plantas aromáticas están tomando cierta importancia.

Existen ocho diferentes sustancias con actividad vitamina E en la naturaleza. Se clasifican en dos familias con los nombres genéricos de tocoles y tocotrienoles. Los miembros de cada familia se designan con las letras griegas: alfa, beta, gamma y delta, y dependiendo de la posición del grupo metilo ($-CH_3$) en el anillo cromano. Normalmente a los tocoles se les llama tocoferoles.

El alfa tocoferol tiene tres grupos en el anillo aromático, mientras que el beta y gamma tocoferol tienen dos y el tocoferol tiene uno. A la fracción D- α Tocoferol es a la única que se le reconoce oficialmente actividad como vitamina E como se indica mediante las unidades Internacionales (UI).

Con respecto a su actividad de vitamina E, el D- α -tocopherol es el más potente, pero su aislamiento de fuentes naturales es difícil. Las preparaciones para alimentación y farmacéuticas se basan en este producto (α -tocopherol) sintetizado artificialmente (DL- α -tocopherol) cuya actividad es inferior.

En la naturaleza, los tocoferoles se encuentran en: los cereales, semillas oleaginosas, nueces y

verduras como las habas y zanahorias. También las semillas de distintos frutos son importantes fuentes. Este contenido se reduce en alrededor de un 30 ó 40% durante el proceso de refinado.

Los tocoferoles se obtienen tanto por extracción de fuentes naturales como por síntesis química.

En la extracción de fuentes naturales, las materias primas más importantes son los desodorizados de aceites vegetales de los que se extraen mediante destilación molecular tocoferoles y tocotrienoles, aunque también esteroides, ésteres de tocoles con ácidos grasos, mono, di y triglicéridos.

Los tocoferoles así obtenidos contienen 4 fracciones de tocoferoles naturales: α , β , γ y δ -tocopherol. Estas moléculas difieren en el número de grupos metilo ($-CH_3$) en el anillo de cromano.

Por lo que se refiere a su actividad antioxidante, difieren unos de otros. Así, mientras que el orden de actividad "in vivo", de mayor a menor, es $\alpha > \delta > \gamma > \beta$, el orden de actividad "in vitro" es $\delta > \gamma > \beta > \alpha$.

Por esta razón, un contenido equilibrado en isómeros permite la utilización del extracto tanto en el campo farmacéutico y de salud humana donde lo más importante es el contenido en D- α -tocopherol, como en otros campos en los que lo importante es el contenido en D- γ -tocopherol.

Dependiendo de su procedencia el contenido en tocoferoles del extracto es más rico en una u otra de sus fracciones. Así los extractos de desodorizado de aceite de maíz o soja procedentes de Norteamérica son más ricos en D- γ -tocopherol, mientras que los de girasol están más enriquecidos en D- α -tocopherol. El único isómero que se encuentra en animales de forma natural es el D- α -tocopherol.

La vitamina E sintetizada químicamente puede ser una mezcla de los ocho diastereoisómeros posibles del D,L- α -tocopherol, si se obtiene por reacción química de la trimetilhidrofenona y el isofitol natural. Si se utiliza el isofitol sintético se obtiene una mezcla de dos isómeros, a saber, 2R, 4'R, 8'R y 2S, 4'R, 8'R - α -tocopherol.

Esta distribución tiene gran importancia en la actividad biológica de la vitamina E. Los ocho diastereoisómeros de la vitamina E sintética son más difíciles de asimilar que los naturales. El rango de disponibilidad biológica de la vitamina E natural es un 36% mayor que la sintética.

La distribución comercial de los tocoferoles naturales se realiza en su mayor parte con una concentración de un mínimo del 50% de riqueza en tocoferoles naturales, siendo el resto un aceite vegetal añadido como excipiente.

Los procedimientos de extracción y refinamiento de los tocoferoles parten del tratamiento de distintos desodorizados de aceites vegetales mediante la extracción previa del insaponificable.

La saponificación y la posterior purificación con disolventes de los limos jabonosos es un procedimiento muy utilizado y bien conocido.

Hickman y Baxter en 1.938 (USPO 2.201.018) describen la destilación a alto vacío para la extracción de antioxidantes y su concentración. Posteriormente, Baxter y Col., en 1.942 (USPO 2.269.243) obtienen la patente sobre las condiciones de destilación a vacío de aceites para recupe-

rar antioxidantes incluyendo la destilación molecular. La distancia entre la película y la superficie de destilación es de 2,54-30,48cm (1-12 pulgadas) a 2,54 -15,24cm (1-6 pulgadas) con presiones entre 1.10^{-4} y 10^{-1} mmHg y temperaturas entre 200° y 250°C.

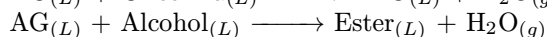
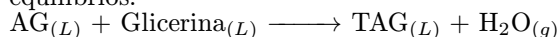
Después, en 1.961, Brown y Mong (USPO 3.188.120) introdujeron la extracción del insaponificable mediante purificación con disolventes, utilizando una saponificación previa con Cl_2Ca , seguida de extracción con disolvente y un agente pulverulento. El insaponificable se destila finalmente para extraer los antioxidantes por destilación molecular.

Otros sistemas de purificación utilizando extracción con disolventes (del insaponificable, y su posterior metilación previa a la destilación molecular) han sido descritos por Manzani y Col. en 1.988.

Descripción detallada de la invención

La presente invención, tal y como se indica en su enunciado se refiere a un procedimiento para la preparación enzimática de extractos oleosos enriquecidos en antioxidantes naturales y, más concretamente, se refiere al empleo de lipasas en la obtención de un extracto enriquecido en antioxidantes naturales a partir de desodorizados de aceites comestibles.

El procedimiento de la presente invención se lleva a cabo básicamente utilizando la destilación a alto vacío y paso corto combinada con la catálisis heterogénea inversa que las lipasas pueden llevar a cabo cuando se dan las condiciones apropiadas que serán descritas detalladamente más adelante en este mismo documento. Las reacciones de esterificación corresponden a los equilibrios:



donde:

AG.- son los ácidos grasos libres presentes en el desodorizado.

TAG.- son los triglicéridos de los anteriores ácidos grasos.

En el presente procedimiento tiene lugar una disminución de la acidez, lo que permite conseguir básicamente dos objetivos.

- como consecuencia del primer equilibrio se logra rebajar la acidez en el producto final haciendo comercialmente viable un extracto de antioxidante al 50% de riqueza que, previamente, tenía una acidez demasiado alta.

- como consecuencia del segundo equilibrio se transforman los ácidos grasos en sus correspondientes ésteres más volátiles, lo que permite una separación más efectiva de los ácidos por destilación de los ésteres.

También puede utilizarse la catálisis enzimática pero en una reacción de lisis, añadiendo agua al medio de reacción y degradando los ésteres de ácidos grasos. De esta forma los ácidos quedan libres y pueden ser separados de los tocoferoles con mayor facilidad que los monoglicéridos y diglicéridos.

Estos dos objetivos no se hallan descritos en los antecedentes bibliográficos detallados.

En la presente invención, se utilizan desodo-

rizados de aceites animales o vegetales que contengan antioxidantes especialmente tocoferoles en cantidades apreciables. Ejemplos de buenas fuentes son los desodorizados de aceites de maíz, algodón, germen de trigo, sésamo, tomillo romero, palma, soja y girasol. También son susceptibles de utilización los desodorizados de aceites de salvado de arroz y semillas de uva.

Tanto en el primer como en el segundo caso, el material de partida se somete a un proceso de desaromatización, para eliminar una serie de componentes volátiles, algunos de los cuales se describen a continuación, y que son en su mayoría aldehídos, cetonas y ésteres de bajo peso molecular, junto con algunos compuestos de carácter aromático.

Sobre este desodorizado sometido a desaromatización puede verificarse una etapa de tratamiento enzimático mediante una lipasa comercial de las que se pueden encontrar en el mercado, pero utilizándose estas como un catalizador de síntesis. Este proceso puede realizarse antes o después de las etapas de destilación a alto vacío. Para ello se aprovecha la aplicación del principio de desplazamiento del equilibrio químico a la reacción de síntesis de un éster a partir de un ácido graso y un alcohol, eliminando continuamente durante la reacción el agua del medio, con lo que se logra desplazar el equilibrio hacia la derecha. La eliminación del agua se logra por la aplicación de calor a un recipiente sometido a un vacío de entre 100 y 60 mmHg. El enzima, dado su coste, es preferible emplearlo inmovilizado en un soporte de zeolitas o polímeros orgánicos de distintos tipos, quedando como un sólido manejable con distinto aspecto, según la casa comercial, de arena o pequeñas perlas de color terroso. El enzima se dispone en el interior de un reactor enzimático, en cuyo interior el enzima queda confinado durante la reacción.

La lipasa que ha de ser usada en la presente invención no se encuentra restringida a un tipo concreto, cualquiera de las conocidas puede utilizarse.

La lipasa puede ser o no selectiva o específica. Ejemplos de lipasas selectivas lo ofrecen las producidas por los microorganismos del género *Rhizopus*, *Mucor* y *Alcaligenes*, y la lipasa pancreática. Ejemplos de lipasas sin selectividad lo ofrecen aquellas producidas por los microorganismos del género *Chromobacterium* y *Candida*.

El proceso de la invención se lleva a cabo a temperaturas moderadas, en las cuales el enzima es activo, y bajo condiciones suaves que evitan la necesidad de condiciones extremadas de acidez o basicidad típicas de los procesos de esterificación química. Las temperaturas preferidas están en el rango de los 20° a 80°C, sobre todo por encima de los 50°C, siendo 70°C la temperatura ideal.

La reacción transcurre en fase líquida y puede ser facilitada si se disuelven los reactivos en un disolvente orgánico. Sin embargo, hay que tener cuidado con el tetrahidrofurano (THF) que elimina una parte del agua necesaria para la actividad enzimática al romper las uniones más débiles, y con la dimetilformamida (DMF) que provoca una inhibición irreversible al eliminar completamente el agua necesaria para la actividad y llegar

a un cambio conformacional irreversible.

En este sentido cabe decir que ciertas sustancias orgánicas como el ácido acético, ciertos aldehídos y cetonas y algunos ésteres tienen efectos inhibitorios sobre la actividad del enzima. Como quiera que compuestos de esta naturaleza se encuentran en abundancia en los desodorizados resulta imprescindible llevar a cabo la reacción enzimática siempre después del proceso de desaromatización que los elimina casi totalmente.

Por otro lado largos tiempos de exposición a cationes de metales pesados como Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} y Hg^{2+} conducen a inhibición de la actividad enzimática (Fe^{2+} reduce del 30 al 60% de la actividad, Fe^{3+} 15-45%, Cu^{2+} 30-70% y Hg^{2+} 0,9%), que en caso de largos tiempos de exposición conducen a inhibición irreversible. Ciertas sales alcalinas y alcalinotérreas como el Na^+ y el Ca^{2+} pueden tener efectos sobre las lipasas utilizadas dependiendo de cuales sean éstas y en que condiciones se utilizan.

Alternativamente, la reacción enzimática puede aplicarse a la lisis de los ésteres de ácidos grasos contenidos en el desodorizado.

En este proceso y al contrario que en la esterificación química, es necesaria el agua en la reacción, normalmente en porcentaje superior al 10%, pero es preferible entre 0,5% y 1% de agua o disolución amortiguadora del pH ideal del enzima. Por tanto no son necesarias precauciones excesivas para eliminar la humedad que puedan contener los desodorizados. Esta humedad contribuye a facilitar la actividad del enzima.

En la reacción de síntesis, los ácidos grasos son los que contiene el desodorizado y cuya proporción variará según el aceite de donde provengan; palma, soja, maíz, girasol, y otros.

El alcohol se incorporará al medio de reacción y pueden emplearse una amplia variedad desde los monohidroxilados de pequeño peso molecular como metanol o etanol, hasta polihidroxilados como el etilenglicol y la glicerina. Esta última junto con el metanol son los preferidos: la primera, porque conduce a la síntesis de acilglicérols, ésteres naturales sin ningún carácter tóxico, y el segundo porque conduce a acil metoxilatos aptos para ser obtenidos antes del proceso de destilación a alto vacío y favorecer así su separación de los tocoferoles por la disminución en la temperatura de ebullición de los ácidos grasos.

Cuando la reacción de síntesis se verifica con alcoholes de bajo punto de ebullición, las condiciones de reacción varían ligeramente puesto que por ejemplo en el caso de utilizar butanol es necesario disminuir la temperatura hasta 10°C y aumentar el vacío hasta 3×10^{-2} bar para conseguir conversiones de un 98%, debido a que la evaporación del alcohol a bajas temperaturas conduce a una disminución de la conversión.

También se recurre a la esterificación usando la destilación fraccionada durante el transcurso de la reacción, de tal forma que el alcohol que se pierde por destilación puede ser añadido a la mezcla de reacción a la misma velocidad que se pierde, y siempre manteniendo las condiciones de vacío y temperatura.

También puede recurrirse a la reparación del

H_2O formada por pervaporación, manteniendo el alcohol en el medio de reacción, utilizando membranas de celofán para separar H_2O y metanol.

También por alcoholisis añadiendo un alcohol de cadena corta a los monoglicéridos formados de tal forma que la glicerina sea sustituida por metanol o etanol.

El objeto de tratar enzimáticamente antes de la destilación está en formar derivados de los ácidos grasos más volátiles y permitir así que en la destilación puedan separarse con más facilidad de los tocoferoles. El tratamiento enzimático después de la destilación consiste en bajar la acidez del producto con un 50% de tocoferoles para transformar los ácidos grasos en triglicéridos y obtener un producto de perfecta aceptación comercial. De esta forma se evita tener que forzar las condiciones de destilación para alcanzar un producto de 98-100% de riqueza en tocoferoles naturales, que tenga que ser después rebajado hasta el 50% de riqueza para ser distribuido comercialmente con un aceite refinado. Este aceite añadido en numerosas ocasiones no tiene nada que ver con el original de procedencia de los antioxidantes, mientras que los triglicéridos de procedencia enzimática tienen perfil de composición en ácidos grasos idéntico al aceite de procedencia.

La destilación se lleva a cabo en dos etapas. En ambas se verifica el calentamiento de una delgada película descendente de producto con alto vacío. Los vapores son condensados en una superficie separada de la película por un espacio libre sin obstrucciones. La distancia entre la película y la superficie de condensación es preferible que sea lo más corta posible. Cuando la distancia es menor que la distancia promedio de las moléculas gaseosas residuales de la especie a separar se habla de destilación molecular.

Se utilizan presiones inferiores a 1 mmHg, incluso es preferible que sean inferiores a 0,1 mmHg, como 0,01 ó 0,001 mmHg.

El antioxidante se obtiene en una primera fracción que destila inmediatamente después de obtener los ácidos grasos. Las temperaturas a las que se obtiene la fracción de ácidos grasos pueden variar considerablemente dependiendo de las condiciones de presión, de destilación y del tipo de desodorizado empleado. La temperatura normalmente se halla entre 200 y 240°C , y especialmente entre 230 y 240°C .

Igualmente ocurre con la temperatura de destilación posterior de los tocoferoles que se halla generalmente entre 210 y 280°C , y especialmente entre 270 y 280°C . Posteriormente cualquiera que sea la etapa se verifica un tratamiento con un disolvente orgánico de la fracción enriquecida en antioxidante y tratada enzimáticamente. Los disolventes pueden ser hidrocarburos aromáticos, alcanos como el hexano y preferiblemente alcoholes, especialmente etanol y metanol. Una vez mezclado en la proporción adecuada el extracto enriquecido en antioxidante y el disolvente, normalmente etanol, se deja reposar, y posteriormente se filtra y centrifuga. Posteriormente se destila el disolvente para separarlo de la mezcla de antioxidantes.

La adición y extracción con etanol no tiene efectos de alcoholisis sobre los triglicéridos for-

mados por reacción enzimática. Igualmente, la filtración a través de papel de filtro tampoco tiene ningún efecto sobre la acidez pero sí sobre el contenido en tocoferol, que disminuye. Sin embargo, esto puede evitarse realizando la filtración y la centrifugación en atmósfera de N₂.

Mediante el procedimiento de la presente invención se obtiene un extracto que tiene una riqueza en tocoferol normalizada a un 50% de concentración. Por lo general, la mayoría de los fabricantes fuerzan las condiciones operativas para alcanzar concentraciones superiores y luego normalizan al 50% de riqueza añadiendo aceites vegetales.

Mediante el procedimiento de la invención se ha logrado ajustar la riqueza a un 50% en el extracto junto con una acidez en torno al 1%, sin necesidad de ningún tipo de adición.

Así, de acuerdo con lo anterior, un extracto típico obtenido por el procedimiento de la presente invención, presenta la siguiente composición:

Componente	%
D- δ -tocoferol	9-11
D-(β + γ)-tocoferol	25-28
D- α -tocoferol	14-16
Campesterol	0,7-0,9
Estigmasterol	0,6-0,8
β -Sitosterol	1,5-1,7
Ac. palmítico	0,3-0,5
Ac. esteárico	0,8-1
Ac. oléico	0,6-0,8
Ac. linoleico	1,8-2
Escualeno	15,3 (aprox)
Monoglicéridos	10,0 "
Diglicéridos	8,4 "
Acet. Estigmasterol	5,2 "

Los componentes que acompañan a los tocoferoles son habituales en los aceites vegetales. Algunos, como los mono y diglicéridos son coadyuvantes específicos del tocoferol en su función antioxidante, al facilitar su dispersión en grasas o su absorción por el estómago.

Breve descripción de las figuras

Figura 1.- Muestra un cromatograma gaseoso de un desodorizado de mezclas de aceites de soja y girasol (1: indica el δ -tocoferol; 2: indica γ + β -tocoferol; y 3: indica α -tocoferol; A.G. indica la posición de los ácidos grasos).

Figura 2.- Muestra un cromatograma gaseoso del tocoferol destilado, después de haberlo sometido a los dos procesos de destilación del Ejemplo 1.

Figura 3.- Muestra un cromatograma gaseoso del producto final obtenido después del tratamiento enzimático, donde se pone de manifiesto el efecto que este tratamiento tiene sobre los ácidos grasos, los cuales ya prácticamente no se detectan.

Figura 4.- Es una representación gráfica en la que se muestra la evolución de la acidez en el proceso del Ejemplo 4. En ordenadas se representa el % de acidez y en abscisas el tiempo en horas.

Figura 5.- Es una representación gráfica en la que se muestra la evolución de la acidez en el proceso del Ejemplo 5. En ordenadas se representa el % de acidez y en abscisas el tiempo en horas.

Modos de realización de la invención

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes Ejemplos, los cuales no pretenden ser limitativos de su alcance.

Ejemplo 1

Se empleó como producto de partida un desodorizado mezcla de aceites de soja y girasol, con una acidez del 28% índice de refracción de 1,48040 y un contenido en tocoferoles de 5,06%. Se sometió a un proceso de desaromatización a 150°C y vacío moderado. El residuo que quedó tenía un 13,5% de acidez, un índice de refracción a 20°C de 1,48740 siendo el contenido en tocoferoles de 7,57% repartidos de la siguiente forma: 1,16% δ -tocoferol, 2,55% γ + β -tocoferol y 3,85% de α -tocoferol.

Posteriormente se sometió a destilación a 230°- 240°C y alto vacío obteniéndose dos fases. Una fase vapor donde no se detecta nada de tocoferol, con una acidez de un 85% y un contenido en escualeno de 4,76%, de estigmasterol (como ejemplo de esteroides) del 1,1%. El índice de refracción en esta fase fue de 1,47040 a 20°C. La fase residual que no destiló tenía las siguientes características, 12,4% de acidez, un 26,0% de tocoferoles distribuidos de la siguiente forma: 2,74% de δ -tocoferol, 5,94% de γ + β -tocoferol y 17,34% de α -tocoferol.

En el siguiente proceso de destilación del antioxidante se obtuvo un destilado con una acidez del 39,9% y un contenido en tocoferoles totales del 53,14%, con un índice de refracción de 1,49040. El residuo tenía una acidez del 1,9% y un contenido en tocoferoles de 21,16% con un índice de refracción de 1,48839. Para disminuir la acidez, la muestra se sometió a una reacción enzimática con una lipasa inmovilizada de *Candida cylindracea*. 600 gr. de este extracto de antioxidante enriquecido se sometieron a reacción con 7,5 gr. de glicerina (pureza del 98% GC) en presencia de 18,22 gr. del enzima a una presión de 70 mmHg y a una temperatura de 65°C. Al cabo de 8 horas de reacción la acidez del producto se ha reducido hasta el 1,6% sin alteración en el contenido en tocoferol. Sucesivas utilizaciones del enzima condujeron a resultados similares sobre la misma matriz de producto. Al cabo de una semana la acidez final era del 2% a las dos semanas era del 2,1% y al cabo de 27 días era del 1,5%.

El tratamiento final con una mezcla de un 60% de etanol y un 40% de agua condujo a la precipitación de un 10% en peso de sólidos que una vez eliminados por centrifugación y abrillantamiento condujeron a un producto completamente traslúcido y fluido.

En las figuras 1, 2 y 3 se ilustra el efecto de la destilación y de la reacción enzimática. En la figura 1 se muestra un cromatograma gaseoso de un desodorizado de mezclas de aceites de soja y girasol (1 indica el δ -tocoferol, el 2 indica γ + β -tocoferol y el 3 indica el α -tocoferol, A.G. indica la posición de los ácidos grasos) donde se aprecia la gran proporción de ácidos grasos. Después de los dos procesos de destilación, el tocoferol des-

tilado se muestra en la figura 2, donde aún se aprecia la presencia de ácidos grasos y por último en la figura 3 se muestra el efecto que el tratamiento enzimático tiene sobre los ácidos grasos que prácticamente no se detectan.

Ejemplo 2

Se empleó como producto de partida una muestra de desodorizado de soja con una acidez del 48,5% y un contenido en tocoferol del 7-8%. Al igual que en el ejemplo 1 se sometió a un proceso de desaromatización que eliminó los volátiles a 250°C y baja presión. Posteriormente el antioxidante se sometió a un proceso de destilación que generó un residuo con un 1,3% de acidez y un 11-15% de tocoferol y un destilado con un 69,1% de acidez y entre un 5-7% de tocoferol. En el siguiente proceso se destiló el residuo a alto vacío y una temperatura entre 270 y 280°C dando lugar a un residuo con un 1,9% de acidez y un 14,0% de tocoferol, y a un destilado con un 39% de acidez y un contenido en tocoferol entre un 62,0-44,0%.

En este caso, para disminuir la acidez, se utilizó una lipasa inmovilizada de *Mucor miehei*. 500 g. del extracto enriquecido se sometieron a reacción con 14,6 g. de glicerina pura en presencia de 20,5 g. de enzima a una presión de 70-75 mmHg y una temperatura de 60°C. Al cabo de ocho horas la acidez final del producto fue del 1,2%.

Al igual que antes la muestra, tras la reacción enzimática, se sometió a un tratamiento de refinado con un disolvente orgánico; etanol y agua 60:40.

Ejemplo 3

En este ejemplo se cuantifica la cantidad de muestra obtenida a partir de una cantidad de materia prima 640 Kg de desodorizado de aceite de girasol con una acidez del 31% y un contenido en tocoferoles del 7,45% que se sometieron a desodorización a una temperatura de 150°C y vacío, obteniéndose 30 Kg de desodorizado con una acidez de 27,1% y un contenido en tocoferol del 1,45%. En la primera destilación a 230-240°C quedaron 350 Kg de residuo con un 15,6% de acidez y un 5,76% de tocoferoles totales, y destilaron 120 Kg de ácidos grasos con un 89,2% de acidez y un 1,5% de tocoferoles. La siguiente etapa de destilación del residuo condujo a unos 30-50 Kg de tocoferol con una acidez del 27,6% y un contenido total en tocoferoles del 50,2%, siendo el 19,3% de δ -tocopherol y un 12,36% de $\gamma + \beta$ -tocopherol y un 18,5% de α -tocopherol, quedando 250 Kg de residuo con un 17% de acidez y un 4,3% de tocoferoles. El exceso de acidez se eliminó por tratamiento enzimático. En este sentido el contenido en ácidos grasos del extracto enriquecido en antioxidantes tuvo la siguiente proporción:

Acido graso	contenido (%) respecto a la acidez total)
palmítico	13,6
esteárico	6,2
oléico	36,7
linoléico	47,4

Con estas proporciones se puede calcular la glicerina necesaria para esterificar 200 g de este

extracto enriquecido, que vendrían a ser unos 2,6 g (se calculan de forma que se establezca una relación molar 1:1 de ácido graso y glicerina para que sean sintetizados los monoglicéridos que, presentes en el extracto enriquecido, favorezcan por su carácter anfipático la solubilización de los tocoferoles), catalizados con 6,17 g de lipasa de *Candida antarctica*. Al cabo de 8 horas de reacción a una presión de 65 mmHg, la acidez final fue del 1,6%. Posteriormente el tocoferol se refinó con una mezcla etanol y agua 60:40.

Ejemplo 4

En este ejemplo se pretende ilustrar la utilización de la lipasa para la esterificación del desodorizado con un alcohol, en este caso la glicerina. 500 Kg de desodorizado de soja, que habían sido desaromatizados a 150°C y vacío, quedando con un contenido en tocoferol del 2,9% y una acidez del 30,6%, se trataron con 215 Kg de glicerina, en presencia de 9 Kg de lipasa de *Candida antarctica*. Se pretende la formación de triglicéridos que no puedan acompañar al tocoferol en la destilación. La evolución de acidez con el tiempo de reacción a 70°C y 70 mmHg se muestra en la figura 4. Después se destilaron los ácidos grasos obteniendo 150 Kg de destilado con un 52,8% de acidez y un 3,6% de tocoferol, y 350 Kg de residuos con un 11% de acidez y un 25,1% de tocoferol total, después se destiló el residuo a 270°C y 0,01 mmHg de vacío, obteniéndose un producto con un 12,2% de δ -tocopherol, el 10,6% de $\gamma + \beta$ -tocopherol y un 18,7% de α -tocopherol. La acidez del producto fue del 17%, por lo que tuvo que ser de nuevo sometido a tratamiento enzimático para disminuir la acidez.

Ejemplo 5

Es un ejemplo similar al anterior pero con un desodorizado mezcla de soja y girasol y el objetivo de obtener un éster más volátil que los correspondientes ácidos grasos. La acidez inicial de la muestra es del 25,6% con un 2,9% de tocoferol, después de ser desaromatizada. Se trataron 500 Kg de desodorizado con 27 Kg de metanol al 90% de riqueza y 16,0 Kg de lipasa de *C. antarctica*, la evolución de la acidez con el tiempo de reacción en un sistema con reflujo se muestra en la figura 5.

La destilación posterior de los ácidos grasos proporcionó un destilado con el 52,8% de acidez y el 3,6% de tocoferol, y un residuo con un 6,1% y un 25,1% de tocoferoles totales. La posterior destilación condujo a un producto con un 10,3% de acidez y un contenido en tocoferol del 49,3%. Este producto de nuevo tiene que ser sometido a un tratamiento enzimático para reducir su acidez.

Ejemplo 6

En este ensayo el enzima no es utilizado para la síntesis de ésteres sino para la degradación de los acilglicérols que los desodorizados de aceites contienen. En el ejemplo, un desodorizado de girasol se desaromatizó con una destilación a vacío a 150°C, quedando un residuo con una acidez de un 32,5% y un contenido en tocoferoles del 7,4%. 500 Kg de este material se trataron con un 10% de agua, se le añadieron 7,5 Kg de lipasa de *Mucor miehei*, y se dejó reaccionar durante 8 horas. Durante este tiempo la acidez evolucionó según la siguiente tabla:

Tiempo (horas)	Acidez (%)
0	34,2
2	33,8
4	35,6
6	35,7
8	36,0

Después se sometió a una destilación de los ácidos grasos a 230°C, dando un destilado con un 89,2% de acidez y un 1,5% de tocoferoles, y que-

dando un residuo con un 15,6% y un 5,76% de tocoferoles. El residuo se sometió a una nueva destilación a 270°C y alto vacío obteniéndose un extracto enriquecido con un 48,6% de tocoferoles totales, 16,8% de δ -tocoferol, un 10,6% de γ + β -tocoferol y un 17,6% de α -tocoferol, y una acidez del 19%. Quedó un residuo con una acidez del 17%. La acidez final del extracto enriquecido ha de ser de nuevo ajustada con una reacción enzimática con una lipasa.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación enzimática de extractos oleosos enriquecidos en antioxidantes naturales, **caracterizado** porque comprende:

(a) someter a una reacción enzimática un desodorizado de aceites animales o vegetales previamente, o no, sometido a una destilación a alto vacío, comprendiendo dicha reacción enzimática:

(i) tratar el referido desodorizado con un alcohol en presencia de una lipasa como catalizador eliminando continuamente el agua formada durante la reacción calentando a una temperatura comprendida entre 10 y 80°C a un vacío de entre 100 y 60 mmHg, pudiendo emplearse el enzima inmovilizado en un soporte de zeolitas o polímeros orgánicos; o bien

(ii) tratar el referido desodorizado con la lipasa como catalizador, en presencia de al menos un 10% de agua para producir la lisis de los ésteres de ácidos grasos contenidos en el extracto;

(b) someter el producto de la etapa anterior a una destilación en dos etapas: la primera a una temperatura comprendida entre 200 y 240°C a la que destila una primera fracción comprendiendo los ácidos grasos y, la segunda, a una temperatura entre 210 y 280°C a la que destilan los antioxidantes;

(c) tratar con un disolvente orgánico la fracción rica en antioxidantes así obtenida, seguido de fil-

tración y centrifugación, tras lo cual se destila el disolvente para separarlo de la mezcla de antioxidantes.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el desodorizado de aceites de partida es un desodorizado de aceites de maíz, algodón, germen de trigo, sésamo, tomillo, romero, palma, soja, girasol, salvado de arroz y semillas de uva.

3. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el alcohol empleado en la etapa (a) (i) está seleccionado entre una amplia variedad de alcoholes comprendidos entre los monohidroxilados de bajo peso molecular y los polihidroxilados.

4. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el alcohol está seleccionado entre metanol, etanol, etilenglicol y glicerina.

5. Procedimiento según la reivindicación 1, donde los antioxidantes corresponden a la familia de los tocoferoles y se encuentran, en el extracto obtenido, en una proporción del 50% aproximadamente.

6. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el disolvente empleado en la etapa (c) está seleccionado entre hidrocarburos aromáticos, alcanos y alcoholes.

7. Procedimiento según la reivindicación 6, **caracterizado** porque el hidrocarburo aromático es hexano y el alcohol es metanol o etanol.

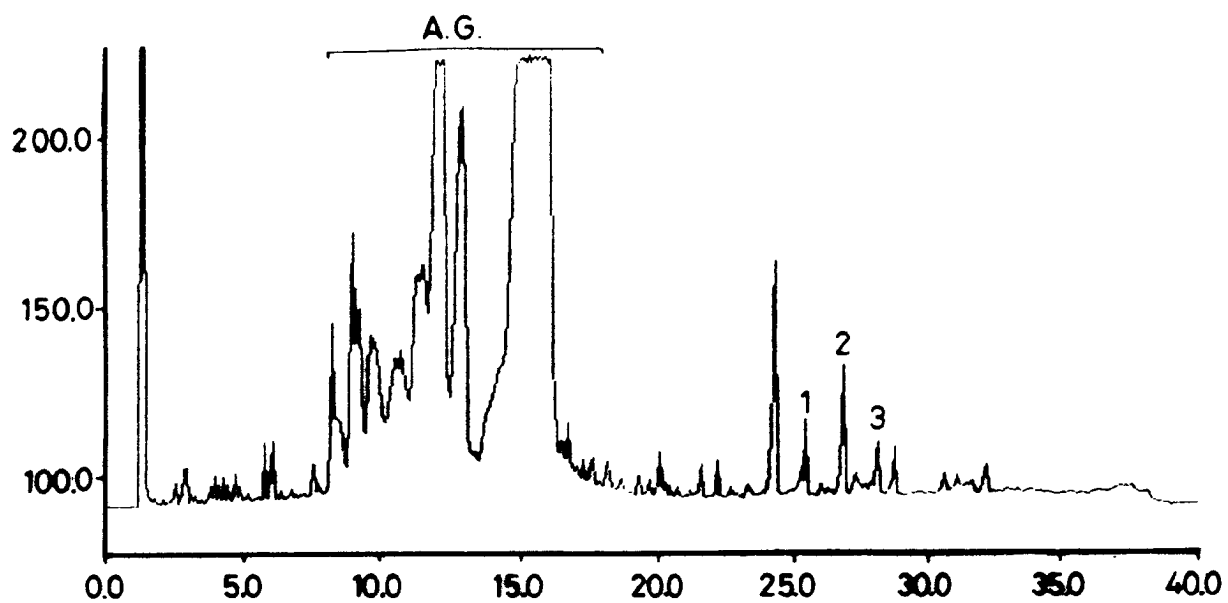


FIG. 1

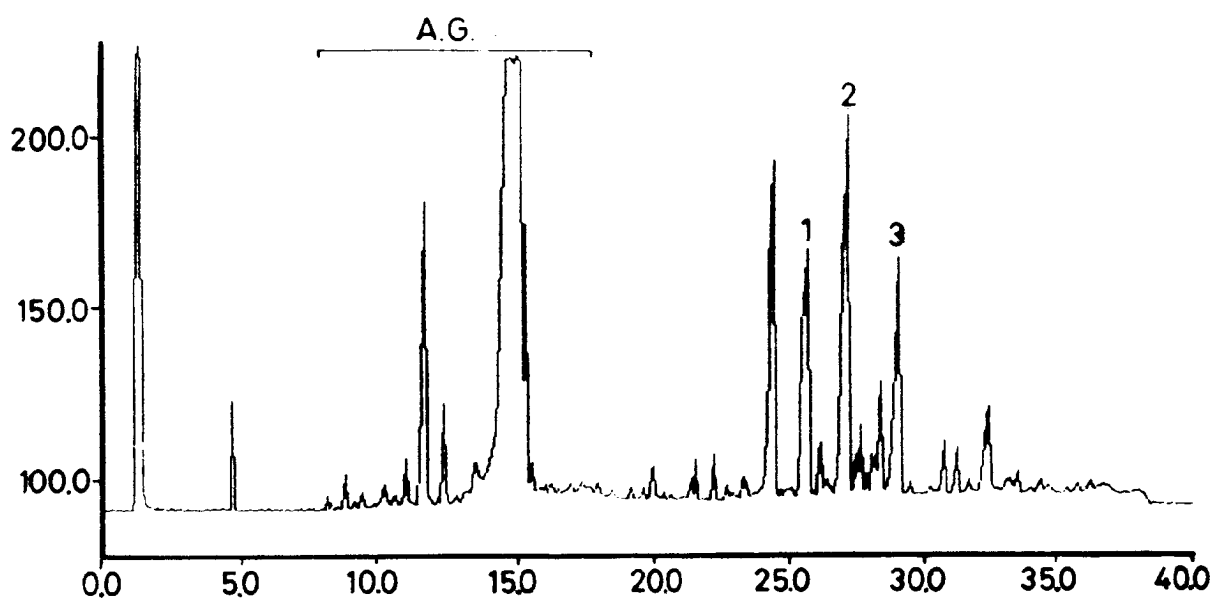


FIG. 2

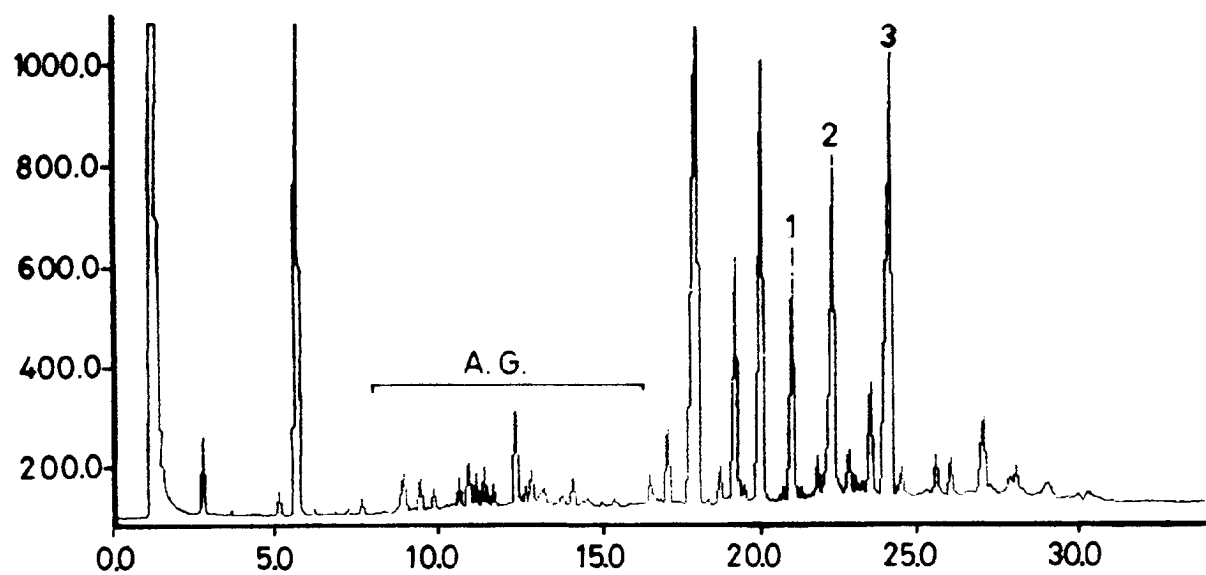


FIG. 3

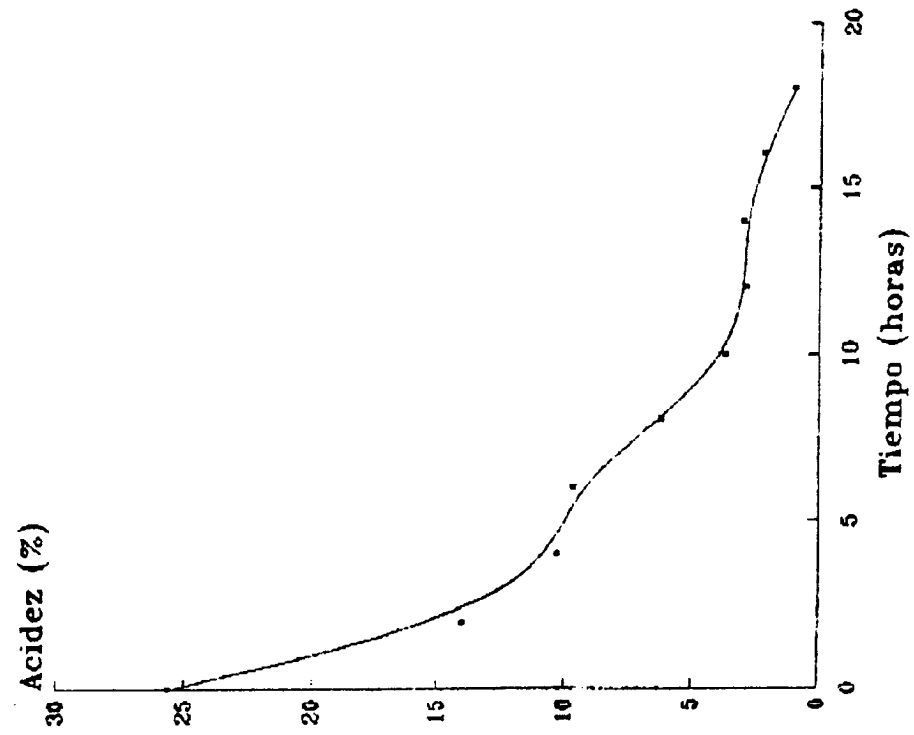


Figura 5

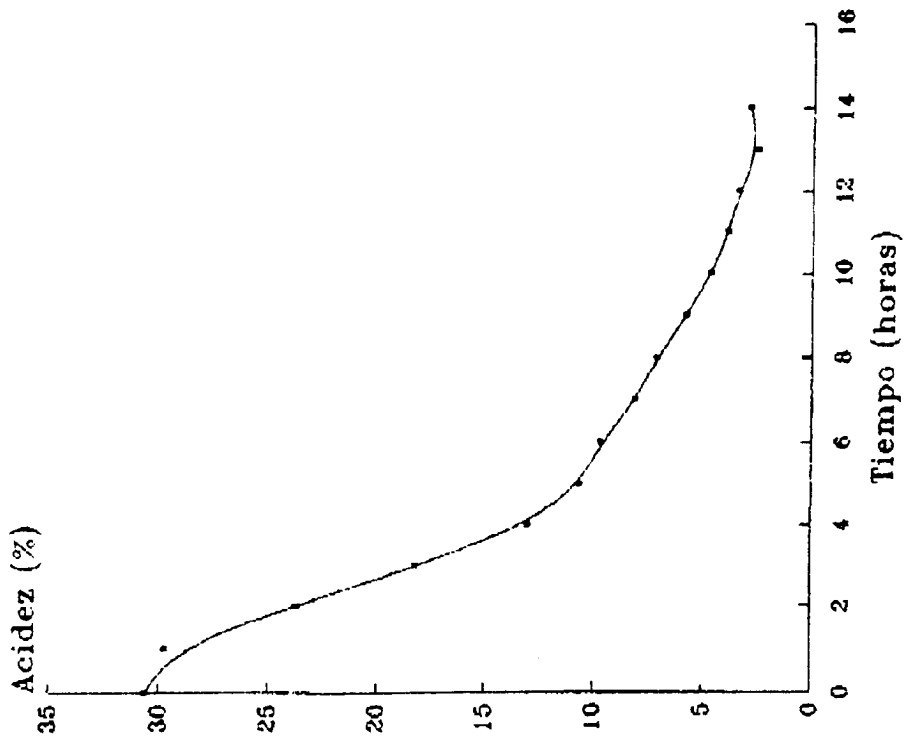


Figura 4



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 093 570
⑫ N.º solicitud: 9501209
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 15.06.95
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁶: C11C1/04, 3/02, 1/10, C11B7/00, C12P7/64, C07D311/72, C12S3/00

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	RAMAMURTHI, S., "Enzymatic pretreatment of deodorizer distillate for concentration of sterols and tocopherols", marzo 1993, J. American Oil Chem. Soc., vol. 70, n.º 3, pp.: 287-295. * todo el documento *	1-7
Y	US-5424457-A (SUMNER, C.Jr. et al) 13.06.95 * todo el documento *	1-7
A	FR-2691974-A (SARPAP; YSOFINE) 10.12.93 * todo el documento *	1-7
Categoría de los documentos citados X: de particular relevancia Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría A: refleja el estado de la técnica O: referido a divulgación no escrita P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud		
El presente informe ha sido realizado ☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones n.º:		
Fecha de realización del informe 30.10.96	Examinador A. Maquedano Herrero	Página 1/1