

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 300 197**

21 Número de solicitud: 200602374

51 Int. Cl.:  
**C12P 7/62** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **15.09.2006**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **01.06.2008**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**01.06.2008**

71 Solicitante/s: **Universidad de Barcelona  
Centro de Patentes de la UB  
Baldiri Reixac, 4  
08028 Barcelona, ES  
Universidad de Murcia**

72 Inventor/es: **Manresa Presas, María Ángeles;  
Bódalo Santoyo, Antonio;  
Gómez Carrasco, José Luis;  
Gómez Gómez, Elisa;  
Bastida Rodríguez, Josefa;  
Máximo Martín, María Fuensanta;  
Hidalgo Montesinos, Asunción María y  
Montiel Morte, María Claudia**

74 Agente: **Segura Cámara, Pascual**

54 Título: **Procedimiento de obtención de polirricinoleato de poliglicerol.**

57 Resumen:

Procedimiento de obtención de polirricinoleato de poliglicerol.

El procedimiento comprende la esterificación de ácido polirricinoleico con poliglicerol catalizada por lipasa (libre o inmovilizada). La lipasa proviene de un hongo del género *Rhizopus*, y más particularmente de *Rhizopus oryzae* o de *Rhizopus arrhizus*. El ácido polirricinoleico (o estólido del ácido ricinoleico) de partida se obtiene por condensación de ácido ricinoleico catalizada por lipasa 1,3 inespecífica, libre o inmovilizada, preferiblemente de *Candida rugosa*. Es útil para fabricar polirricinoleato de poliglicerol ("polyglycerol polyricinoleate", PGPR) de calidad alimentaria, evitando la formación de los subproductos asociados a los procedimientos tradicionales, que utilizan catalisis química y altas temperaturas.

ES 2 300 197 A1

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de obtención de polirricinoleato de poliglicerol.

5 La presente invención trata de un procedimiento biotecnológico para la obtención o manufactura industrial de un aditivo alimentario utilizado como agente emulsionante.

## Estado de la técnica

10 El polirricinoleato de poliglicerol ("polyglycerol polyricinoleate", PGPR en lo que sigue) se utiliza como aditivo en la industria alimentaria (p. ej. como sucedáneo de la manteca de chocolate), aunque sus propiedades como estabilizador de emulsiones agua/aceite le confieren utilidad en muchas otras aplicaciones. En la actualidad el PGPR de uso alimentario se obtiene por procedimientos químicos.

15 Uno de los procedimientos químicos conocidos (cf. R. Wilson *et al.*, "Overview of the preparation, use and biological studies of polyglycerol polyricinoleate (PGPR)"; *Food and Chemical Toxicology* 1998, vol. 36, pp. 711-718), que utiliza como materias primas el glicerol y el aceite que se extrae de la planta *Ricinus communis* (mayoritariamente un triglicérido del ácido ricinoleico y el glicerol), comprende las siguientes cuatro etapas:

20 a) La hidrólisis del triglicérido con agua y vapor a 400 psi, sin la adición de ningún catalizador. Los ácidos grasos resultantes se separan del glicerol lavando con agua. Estos ácidos grasos son 89-90% de ácido ricinoleico, 3-8% de ácido oleico, 3-7% de ácido linoleico y 0-2% de ácido esteárico.

25 b) La condensación de los ácidos grasos, a elevada temperatura, operando a vacío y en atmósfera de CO<sub>2</sub> para prevenir la oxidación. La reacción se deja avanzar hasta que se alcanza un NA (NA) de 35, lo cual equivale a una media de 5 ácidos gramos por molécula de producto condensado.

30 c) La preparación de poliglicerol, que se realiza calentando el glicerol a temperaturas por encima de 200°C y en presencia de una pequeña cantidad de hidróxido potásico. Este reacción se realiza burbujeando CO<sub>2</sub> para prevenir la oxidación y el glicerol que no polimeriza se elimina por destilación al final de la reacción.

d) La mezcla, en las proporciones adecuadas, del poliglicerol y del ácido graso condensado. Las condiciones de la reacción son las mismas utilizadas en la condensación de los ácidos grasos, y el proceso continúa hasta que se alcanza el NA requerido.

35 Otro de los procedimientos químicos conocido es el descrito en la solicitud de patente GB 2.073.232 A, donde se hace referencia a otros métodos conocidos de preparación de PGPR que implican una condensación autocatalítica de ácido ricinoleico, y una reacción catalizada por un álcali entre el ácido graso condensado y el poliglicerol. El procedimiento descrito en dicha solicitud requiere tiempos de reacción muy largos, lo cual afecta tanto a los costes como a la calidad de los productos finales. Este procedimiento, que es una modificación del proceso clásico con el fin de acortar los tiempos de reacción, comprende la condensación del ácido ricinoleico utilizando como catalizador un ácido de Lewis (0.05-0.5%), seguida de la esterificación del condensado obtenido con poliglicerol. Esta segunda reacción se cataliza también por el ácido de Lewis contenido en el condensado. Estas reacciones se llevan a cabo a alta temperatura (180-230°C), presión reducida y atmósfera inerte. Los catalizadores utilizados son compuestos de aluminio, cloruro férrico o acetato férrico. Las proporciones que utilizan en la esterificación del ácido graso condensado a poliglicerol son de 10:1.

50 Finalmente, otro procedimiento químico de preparación de PGPR se describe en la patente US 5.736.581, donde se dice que los PGPRs comerciales no son adecuados como emulsionantes para algunas aplicaciones cosméticas. Se describen procedimientos a alta temperatura y que utilizan catalizadores químicos.

55 Un problema que presentan los procedimientos conocidos para la obtención de PGPRs para uso alimentario, deriva de que los procesos de fabricación se llevan a cabo a alta temperatura y de que uno de los materiales de partida es un ácido graso. Estas circunstancias provocan la aparición de multitud de reacciones secundarias que dan lugar a productos secundarios, no deseados y difíciles de controlar. Como consecuencia, el producto final presenta problemas de olor y color que dificultan o impiden su utilización en la industria alimentaria.

## Explicación de la invención

60 La presente invención proporciona un procedimiento biotecnológico de obtención de polirricinoleato de poliglicerol ("polyglycerol polyricinoleate", PGPR) que comprende la esterificación de ácido polirricinoleico con poliglicerol catalizada por lipasa. En una realización particular la lipasa proviene de un hongo del género *Rhizopus*, y más particularmente de *Rhizopus oryzae* o de *Rhizopus arrhizus*. Por otra parte, la lipasa puede estar libre o inmovilizada. En una realización particular del segundo caso la lipasa está inmovilizada sobre resina de intercambio iónico.

65 En una realización preferida del procedimiento de la presente invención, el ácido polirricinoleico de partida se obtiene por condensación del ácido ricinoleico catalizada por lipasa 1,3-inespecífica. Resulta especialmente preferida la lipasa que proviene de *Candida rugosa*, bien en forma libre, bien en forma inmovilizada. El ácido polirricinoleico

es el estólido del ácido ricinoleico. Estólido es un nombre genérico para poliésteres oligoméricos de ácidos grasos que tienen grupos hidroxilo, en los que el grupo carboxilo y el grupo hidroxilo se deshidratan formando oligómeros. El ácido ricinoleico es el ácido (9Z,12R)-12-hidroxí-9-octadecenoico, y representa aproximadamente el 90% del contenido en ácidos grasos de los triglicéridos del aceite de ricino.

Se conoce la esterificación de ácidos grasos con glicerol catalizada por lipasas. También se conoce la síntesis enzimática de ésteres de ácidos grasos con poliglicerol (cf. D. Charlemagne *et al.*, “Enzymatic synthesis of poliglicerol fatty acids esters in a solvent free system”, *JAOCS* 1995, vol. 72, pp. 61-65; S. Matsumura *et al.*, “Enzymatic synthesis, surface activity, antimicrobial properties and biodegradability of di- and triglycerol fatty acid esters”, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.* 1999, vol. 48, pp. 681-692). En estos trabajos se describe la interesterificación de ésteres metílicos de ácidos grasos y poliglicerol en presencia de una lipasa 1,3-específica de *Mucor miehei*. Por otro lado, en la solicitud de patente JP 61187765 se describe un proceso similar que usa lipasas libres provenientes de *Aspergillus* y de *Rhizopus*. Sin embargo, en el estado de la técnica anterior no se conoce la esterificación de ácidos grasos condensados con poliglicerol catalizada por una lipasa.

La condensación de ácido ricinoleico para obtener ácido polirricinoleico, previa a la reacción objeto de la presente invención, puede llevarse a cabo mediante catálisis por lipasa 1,3-inespecífica, libre o inmovilizada, de cualquiera de las formas conocidas en la técnica (cf. A. Bódalo *et al.*, “Enzymatic biosynthesis of ricinoleic acid estolides”, *Biochemical Engineering Journal* 2005, vol. 26, pp. 155-158; Y. Yoshida *et al.*, “Enzymatic synthesis of estolides by a bioreactor”, *JAOCS* 1997, vol. 74, pp. 261-267).

Según la presente invención, la esterificación del ácido polirricinoleico (APR) se realiza añadiendo la cantidad apropiada de poliglicerol (p. ej. diglicerol o poliglicerol-3). Esta esterificación puede en principio ser catalizada tanto por lipasas inespecíficas como por lipasas 1,3-específicas.

La presente invención presenta la ventaja de permitir la fabricación de PGPR de calidad alimentaria. Esto es posible gracias a que se lleva a cabo mediante síntesis enzimática y a temperaturas próximas a la ambiente. Así se evitan las reacciones secundarias y la formación de subproductos que tienen lugar cuando el proceso se lleva a cabo por los procedimientos conocidos, utilizando catálisis química y altas temperaturas.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

### Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra la variación con el tiempo de la esterificación enzimática de ácido polirricinoleico catalizada por lipasas procedentes de tres microorganismos.

### Exposición detallada de modos de realización

#### *Esterificación enzimática de ácido polirricinoleico con poliglicerol*

Se realizaron experimentos en reactores agitados, termostatados a 40°C y abiertos a la atmósfera, en los cuales se habían introducido, en este orden, las cantidades de enzima que aparecen en la Tabla 1, 5 g de agua, 30 g de ácido polirricinoleico (APR) de número ácido menor (NA) que 45, y 6 g de poliglicerol-3 (Solvay). La Tabla 1 muestra los resultados para 24 lipasas diferentes. En las dos últimas columnas de la Tabla 1 se muestran los NA después de 24 h y después de una semana. Se observa que lipasas de muy diversas fuentes son capaces de catalizar la esterificación de la presente invención.

La reacción de esterificación se llevó a cabo, además de catalizada por lipasas de distintas fuentes, con distintas cantidades de biocatalizador, utilizando distintas proporciones APR:poliglicerol (entre 1:1 y 11:1), utilizando poligliceroles de distintos grados de polimerización (diglicerol y poliglicerol-3), a distintas temperaturas (entre 30 y 60°C), con diferentes cantidades de agua inicialmente en el reactor (entre 40000 y 250000 ppm), con distintos sistemas de agitación, y en reactores abiertos a la atmósfera o cerrados para trabajar a presión reducida. En todos los casos la esterificación tuvo lugar sustancialmente, aunque a diferentes velocidades. El seguimiento de la reacción se realizó por valoración con KOH factorado, determinando el NA de las muestras tomadas del reactor.

ES 2 300 197 A1

TABLA 1

Número ácido (NA) para lipasas de distintas fuentes, con distintas actividades comerciales y distintas cantidades de ácido polirricinoleico (APR)

Fuente de lipasa		Actividad (U/mg)	APR añadido (mg)	NA (24 h)	NA (168 h)
<i>Aspergillus oryzae</i>	FLUKA	50	100	13	11
<i>Aspergillus niger</i>	FLUKA	200	500	33	29
<i>Aspergillus sp.</i>	FLUKA	0.5	100	33	30
<i>Mucor javanicus</i>	FLUKA	10	500	21	9
<i>Mucor miehei</i>	FLUKA	1	100	14	8
<i>Penicillium roqueforti</i>	FLUKA	> 0.4	500	32	28
<i>Rhizomucor miehei</i>	FLUKA	0.5	50	16	9
<i>Rhizopus arrhizus</i>	FLUKA	10	1000	15	11
<i>Rhizopus niveus</i>	FLUKA	1.5	1000	18	15
<i>Rhizopus oryzae</i>	FLUKA	> 30	500	14	14
<i>Chromobacterium viscosum</i>	FLUKA	2500	25	6	7
<i>Pseudomonas sp.</i>	FLUKA	1500-2500	10	8	8
<i>Pseudomonas sp.</i> Tipo B	FLUKA	160	50	6	8
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	FLUKA	300	50	11	9
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	FLUKA	40	40	24	5
<i>Pseudomonas cepacia</i>	FLUKA	50	100	12	8
<i>Candida rugosa</i>	SIGMA	700-1500	250	29	30
<i>Candida cylindracea</i>	FLUKA	2	1000	30	29
<i>Candida antarctica</i>	FLUKA	3	50	30	20
<i>Candida lipolytica</i>	FLUKA	0.001	1000	35	32
Germen de trigo	FLUKA	0.1	500	37	47
Pancreas de cerdo	SIGMA	30-90	250	30	25
Pancreas de cerdo	FLUKA	20.6	1000	33	26
Pancreas de cerdo	FLUKA	23.9	250	29	29

## ES 2 300 197 A1

Algunas de las lipasas que mostraron actividad en estado nativo como catalizadores de esta segunda etapa del proceso (lipasas de *Mucor javanicus*, de *Rhizopus oryzae* y de *Rhizopus arrhizus*), se inmovilizaron por adsorción en una resina de intercambio aniónico (Lewatit MonoPlus MP64). Los resultados de tales inmovilizaciones se muestran en la Tabla 2. La actividad de las lipasas inmovilizadas fue ensayada en un reactor tanque discontinuo abierto a la atmósfera, a 40°C, en el cual se introdujeron 30 g de ácido polirricinoleico de NA < 45, 6 g de poliglicerol-3 (Solvay) y 5 g de derivado inmovilizado empapado en agua (cada 5 g de resina de intercambio retenía aproximadamente 3 g de agua). El seguimiento de estos procesos se realizó mediante la determinación del NA de muestras tomadas del reactor y los resultados de los mismos se muestran en la Fig. 1. En esta Figura se observa la evolución con el tiempo de la esterificación catalizada por lipasa de tres fuentes distintas inmovilizada por adsorción en la resina de intercambio Lewatit Monoplus MP64. En dos de los tres procesos se obtuvo PGPR con un NA < 10.

TABLA 2

*Grado de inmovilización del enzima por adsorción sobre la resina*

Fuente de lipasa	mgE/g soporte
<i>Mucor javanicus</i>	14.11
<i>Rhizopus oryzae</i>	13.63
<i>Rhizopus arrhizus</i>	5.16

### Ejemplo 1

*Obtención de polirricinoleato de poliglicerol mediante lipasas libres*

En un reactor agitado verticalmente, abierto a la atmósfera y termostatado a 40°C, se introdujeron, por este orden, 400 mg de lipasa de *Candida rugosa* (Sigma), 4 ml de agua y 30 g de ácido ricinoleico comercial (NA = 180). Después de 150 horas se obtuvo un ácido polirricinoleico de NA = 50.

En un dispositivo como el anterior, a la misma temperatura, se introdujeron, por este orden, 500 mg de lipasa de *Rhizopus oryzae* (Fluka), 5 ml de agua, 30 g del ácido polirricinoleico obtenido en la etapa anterior, y 6 g del poliglicerol-3 (Solvay). Después de 24 h el NA del PGPR fue de 14.

### Ejemplo 2

*Obtención de polirricinoleato de poliglicerol mediante lipasas inmovilizadas*

En un Erlenmeyer se introdujeron 5 g de resina de intercambio aniónico Lewatit Monoplus MP64 (Fluka) y una suspensión de 1 g de lecitina de soja en 50 ml de agua. Después de 24 h con agitación orbital a temperatura ambiente se lavó la resina con agua y se le añadieron 50 ml de una disolución de 10 mg/ml de lipasa de *Candida rugosa* (Sigma) en tampón acetato 0.1 M (pH = 5.0). La mezcla se dejó en reposo a 4°C durante 48 h. Transcurrido este tiempo, el derivado obtenido se lavó varias veces con agua.

En un reactor agitado verticalmente, abierto a la atmósfera, termostatado a 40°C, se introdujeron 30 g de ácido ricinoleico comercial (NA = 180) y los 5 g del derivado inmovilizado anteriormente obtenido. La resina retuvo 0.6 g de agua por gramo de resina seca, por lo que se estaban introduciendo en el reactor 3 g de agua. Después de 150 h se obtuvo un ácido polirricinoleico de NA = 40. El derivado inmovilizado se separó del medio por filtración.

Por el mismo procedimiento anterior, y en el mismo soporte, se inmovilizó una lipasa de *Rhizopus oryzae* (Fluka).

En un reactor abierto a la atmósfera, vigorosamente agitado y termostatado a 40°C, se introdujeron, por este orden, 30 g del ácido polirricinoleico obtenido en la etapa anterior, 6 g del poliglicerol-3 de Solvay y los 5 g del derivado inmovilizado anteriormente obtenido. La resina retenía 0.6 g de agua por gramo de resina seca, por lo que se estaba introduciendo en el reactor 3 g de agua. Después de 168 h se obtuvo un PGPR de NA igual a 9. El derivado inmovilizado volvió a separarse del medio por filtración.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de obtención de polirricinoleato de poliglicerol que comprende la esterificación de ácido polirricinoleico con poliglicerol catalizada por lipasa.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, donde la lipasa proviene de un hongo del género *Rhizopus*.
- 10 3. Procedimiento según la reivindicación 2, donde el hongo se selecciona entre *Rhizopus oryzae* y *Rhizopus arrhizus*.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la lipasa está libre.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la lipasa está inmovilizada.
- 15 6. Procedimiento según la reivindicación 5, donde la lipasa está inmovilizada sobre resina de intercambio iónico.
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el ácido polirricinoleico se obtiene previamente por condensación de ácido ricinoleico catalizada por lipasa 1,3-inespecífica.
- 20 8. Procedimiento según la reivindicación 7, donde la lipasa proviene de *Candida rugosa*.
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, donde la lipasa está libre.
- 25 10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, donde la lipasa está inmovilizada.

30

35

40

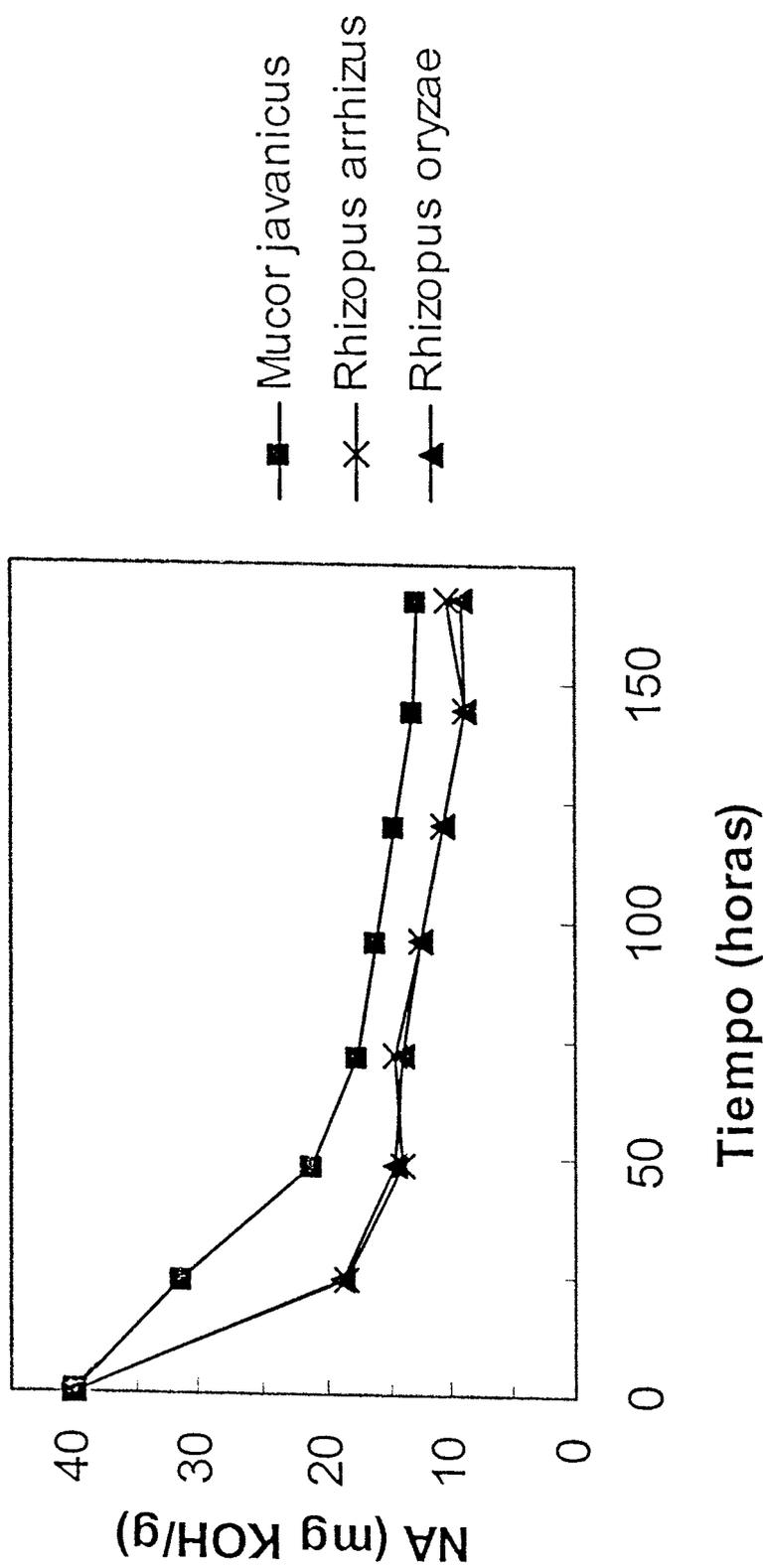
45

50

55

60

65



**FIG. 1**



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 300 197

② Nº de solicitud: 200602374

③ Fecha de presentación de la solicitud: 15.09.2006

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: C12P 7/62 (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 5736581 A (ANSMANN, A. et al.) 07.04.1998, todo el documento.	1-10
A	GB 2073232 A (VEB KOMBINAT ÖL U. MARGARINE MAGDEBURG) 14.10.1981, todo el documento.	1-10
A	WILSON, R. et al.: "Overview of the Preparation, Use and Biological Studies on Polyglycerol Polyricinoleate (PGPR)", Food Chem. Toxicol. (1988), vol. 36, pp.: 711-718, todo el documento.	1-10
A	BÓDALO-SANTOYO, A. et al.: "Enzymatic Biosynthesis of Ricinoleic Acid Estolides", Biochem. Engineer. J. (2005), vol. 26, pp.: 155-158, todo el documento.	7-10

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

29.04.2008

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

1/1