



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 267 137**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/64** (2006.01)

**C12N 1/00** (2006.01)

**C12N 1/12** (2006.01)

**C12N 1/14** (2006.01)

**A23D 9/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **97914289 .0**

86 Fecha de presentación : **21.03.1997**

87 Número de publicación de la solicitud: **0894142**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **03.02.1999**

54

Título: **Aceite microbiano que contiene ácido graso poli-insaturado y método de producir aceite a partir de biomasa pasteurizada y granulada.**

30

Prioridad: **28.03.1996 EP 96200835**  
**28.03.1996 EP 96200837**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.03.2007**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.03.2007**

73

Titular/es: **DSM IP Assets B.V.**  
**Het Overloon 1**  
**6411 TE Heerlen, NL**

72

Inventor/es: **Bijl, Hendrik, Louis;**  
**Wolf, Johannes, Hendrik;**  
**Schaap, Albert y**  
**Visser, Johannes, Martinus, Jacobus**

74

Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 267 137 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**

Aceite microbiano que contiene ácido graso poli-insaturado y método de producir aceite a partir de biomasa pasteurizada y granulada.

**Campo de la invención**

La presente invención se relaciona con un aceite que contiene ácido graso poli-insaturado (PUFA), especialmente con un aceite microbiano estable y puro que contiene al menos un ácido graso poli-insaturado. Este aceite puede ser obtenido de una biomasa o caldo de fermentación que ha sido sometida a pasteurización.

**Antecedentes de la invención**

Ha sido una tendencia creciente incluir productos lípidos que contienen ácidos grasos poli-insaturados derivados a partir de los procesos de fermentación en varios alimentos. De importancia es la necesidad recientemente establecida de incorporar ácidos grasos poli-insaturados en preparados para lactantes.

Varios procesos han sido descritos para la producción fermentativa de lípidos o aceites que contienen ácidos grasos poli-insaturados. Ejemplos son EP-A-0155420 para la producción de lípidos que contienen ácido  $\gamma$ -linoleico (GLA) a partir de *Mortierella*; EP-A-0223960, EP-A-0276541 y WO-A-92/13086 para la producción de aceite que contiene ácido araquidónico (ARA) a partir de *Mortierella* y/o *Pythium*; WO-A-91/07498 y WO-A-91/11918 para la producción de aceite que contiene ácido docosahexanoico (DHA) a partir de *Cryptocodinium cohnii* o *Thraustochytrium*, y WO-A-91/14427 para la producción de aceite que contiene ácido eicosapentanoico (EPA) a partir de *Nitzschia*; y US 5539133 para la producción de ARA y EPA a partir de microalgas.

Típicamente, una especie microbiana que produce un lípido que contiene el(los) ácido(s) graso(s) poli-insaturado(s) deseado(s) es cultivada en un medio apropiado, la biomasa en entonces cosechada y pre-tratada para permitir la subsiguiente extracción del lípido de la biomasa microbiana con un solvente apropiado. El lípido así extraído está en forma cruda y es a menudo sometido a varios pasos de refinación.

El pre-tratamiento de la torta de biomasa húmeda es usualmente por secado, tal como liofilización o secado por atomización y/o por desintegración mecánica, tal como homogenización o molido. El secado de la biomasa es deseado para reducir la cantidad de solvente y para prevenir emulsiones inoportunas. Si un lípido sensible a la oxidación y al calor, tal como un lípido que contiene ácido graso poli-insaturado, necesita ser aislado, se necesitan tomar cuidados especiales para asegurar que la exposición a condiciones desfavorables, que estimulan la degradación inducida por el oxígeno, sea evitada lo más posible. Sin embargo, los métodos de tratamiento de la biomasa usados en el arte no evitan tales condiciones desfavorables.

Yamada y otros, Aplicaciones Industriales de los aceites de célula única, Eds. Kyle y Ratledge, 118-138 (1992) describen un aceite que contiene ácido araquidónico purificado a partir de *Mortierella alpina* con un contenido de triglicérido de 90%. En los procesos de recuperación, la biomasa cultivada es secada y triturada por un molino de bolas antes de la extracción del hexano. Este método tampoco minimiza la exposición a condiciones desfavorables.

EP-A-0520624 (Efamol) describe un aceite de glicerol natural o sintético que comprende al menos 20% de DLMG. WO-A-92/12711 (Martek) se refiere a mezclas de aceites microbianos, para suplementar los preparados para lactantes, en particular mezclas de aceites que contienen ARA, DHA y EPO. GB 1466853 (Alexander/Rosedowns) se refiere a la extracción de aceite a partir de células de levadura por ruptura de las paredes de las células de levadura, y formando el polvo resultante en aglomerados que son luego descascarados.

FR 2210662 (British Petroleum) se refiere a la eliminación de sustancias, tales como hidrocarburos o lípidos, de los productos de microorganismos. FR 2674865 (Bioprox) se refiere a un proceso para la producción de un concentrado líquido que contiene ácido láctico de un material de partida de origen lácteo que contiene lactosa. US 5,411,873 (Genencor) se refiere al proceso para producir polipéptidos heterólogos, en particular carbonil hidrolasas no humanas.

Así, los lípidos que contienen ácido graso poli-insaturado aislados a partir de biomasa microbiana de acuerdo a los métodos conocidos en el arte son expuestos, a condiciones que simulan la oxidación lo que afecta negativamente la calidad del aceite.

**Descripción de la invención**

De acuerdo a un primer aspecto de la presente invención se proporciona un aceite microbiano, que comprende, al menos un ácido graso poli-insaturado (PUFA), el cual tiene un contenido de triglicéridos de 93 a 97%. Ha sido encontrado que este aceite es particularmente estable en comparación con los aceites que contienen PUFA del arte anterior. El PUFA es producido por uno o más microorganismos, apropiadamente en un proceso de fermentación. El PUFA es recuperado por varios pasos del proceso, a partir de la biomasa, la cual es esencialmente el material resultante del proceso de fermentación en el que el PUFA es producido.

## ES 2 267 137 T3

Ya que el aceite de la presente invención puede ser derivado de manera microbiana, será apreciado que este aceite no cubre los aceites sintéticos. Aunque no se desea estar atados por ninguna teoría, el solicitante cree que puede haber un número de explicaciones del por qué el aceite de la presente invención es más estable que aquellos descritos antes de la presente invención.

5

El aceite puede contener uno o más compuestos que estaban presentes en la biomasa. Mientras más de esos compuestos puede actuar como un anti-oxidante. Alternativamente o en adición, uno o más de los compuestos pueden inactivar (parcialmente, o al menos inhibir) una o más sustancias oxidantes presentes en el aceite.

10

Un número de sustancias puede ser responsable de la degradación de los aceites que contienen PUFA. Estas incluyen metales que pueden actuar como catalizadores, por ejemplo cobre, hierro y/o zinc. Otros metales similares, pueden actuar como iniciadores de radicales. Otras influencias de degradación son la luz y el calor. Puede haber una o más sustancias que pueden, por ejemplo, ser capaces de acomplejarse con uno o más de estos metales, o pueden actuar como un limpiador de radical.

15

Alternativamente, el procedimiento para obtener el aceite de la invención puede eliminar una o más sustancias oxidativas o que provocan la oxidación que pueden haber estado originalmente presentes en la biomasa.

20

Se cree que la degradación es particularmente alta cuando el PUFA es ARA, y por lo tanto una sustancia en el aceite puede inhibir o prevenir la degradación de este PUFA.

25

El procedimiento de obtención del aceite de la invención, que será descrito con más detalles después, puede involucrar la formación de una forma de partícula granular, o incluso gránulos secados, que pueden tener el PUFA dentro de los gránulos o las formas granulares menos accesibles a la atmósfera, y en particular el oxígeno, reduciendo de esta forma las oportunidades de oxidación.

En el proceso de la invención el contenido de esterol puede ser reducido, de manera que la máxima cantidad de esteroides (tal como el 5-desmosterol) sea 1.5% en peso.

30

El aceite puede contener uno o más inhibidores de radicales, limpiadores de radicales y/o antioxidantes.

35

La presente invención entonces se relaciona con un aceite microbiano que contiene ácido graso poli-insaturado (PUFA) con un alto contenido de triglicéridos, y un alto tiempo de inducción Rancimat (por ejemplo al menos 5 horas a 80°C). El ácido graso poli-insaturado puede ser un ácido graso poli-insaturado C18, C20 o C22  $\omega$ -3 y C18, C20, o C22  $\omega$ -6. Preferiblemente es un ácido graso poli-insaturado C20 o C22  $\omega$ -3, o C20  $\omega$ -6. En particular el PUFA es ácido araquidónico (ARA), ácido eicosapentanoico (EPA) y ácido docosahexanoico (DHA). Ejemplos de tales aceites son el aceite que contiene ácido araquidónico a partir de *Mortierella* o un aceite que contiene ácido docosahexanoico a partir de *Cryptocodinium*.

40

El aceite de la invención puede ventajosamente ser usado en comidas, alimentos o composiciones alimenticias o sirve como un suplemento nutricional, para humanos así como para animales. En adición, el aceite de la invención puede ser usado en cosméticos. Los gránulos o partículas granulares pueden encontrar uso como una composición nutritiva o alimenticia o suplemento.

45

El aceite de la invención contiene uno o más ácidos grasos poli-insaturados y tiene un contenido de triglicéridos de 93 a 97%. Este aceite tiene mucha más alta estabilidad oxidativa que los aceites microbianos que contienen ácidos grasos poli-insaturados descritos en el arte.

50

El aceite de la invención preferiblemente tiene un contenido de triglicéridos  $\geq 95\%$ .

55

Puede tener además un tiempo de inducción Rancimat que es  $\geq 5$  horas a 80°C, preferiblemente un tiempo de inducción de 5-16 horas a 80°C. Más apropiadamente puede tener un tiempo de inducción de 7-16 horas a 80°C, opcionalmente un tiempo de inducción de 10-16 horas a 80°C. Los tiempos de inducción Rancimat son medidos a una temperatura de 80°C, ya que esta temperatura es mejor seguida por los aceites que contienen ácidos grasos poli-insaturados. Cuando es medido a 100°C, el aceite de la invención puede tener un tiempo de inducción de más de 3 a 5 horas.

60

Debe ser notado que el tiempo de inducción Rancimat del aceite de la invención es medido sin la presencia de compuestos estabilizadores exógenamente adicionados, tal como los antioxidantes. Obviamente, la presencia de aditivos estabilizadores en un aceite incrementará su tiempo de inducción Rancimat. Los aditivos estabilizadores, tales como los antioxidantes, pueden originarse de adiciones a ciertos pasos de los procesos de recuperación de aceite, por ejemplo en el medio donde el microorganismo es cultivado, o de adiciones al propio aceite. Las pruebas Rancimat incluyen calentar la sustancia, mientras es soplado aire encima de la misma. Si la sustancia se oxida, entonces su peso aumenta, y usualmente ocurre la oxidación relativamente rápido después de un tiempo particular. Este tiempo por lo tanto puede dar una indicación de la estabilidad, contra la oxidación, de la sustancia.

65

Características adicionales del aceite de la invención pueden incluir un bajo contenido de diglicéridos, preferiblemente por debajo de 2%, y/o un bajo contenido de monoglicéridos, preferiblemente por debajo de 0.1%. Puede tener

## ES 2 267 137 T3

un color claro, un bajo nivel de aroma extraño y/o un bajo valor de anisidina (anisidina es una prueba para aldehídos, un producto de degradación por oxidación).

5 El valor de anisidina típicamente varía desde 0.1 a 5, preferiblemente desde 0.1 a 2, más preferiblemente desde 0.1 a 1. El color del aceite de la invención es típicamente amarillo a amarillo claro.

10 El aceite microbiano de la invención es típicamente uno que predominantemente (o solamente) contiene un ácido graso poli-insaturado particular, pero que puede adicionalmente contener cantidades menores de otros ácidos grasos poli-insaturados. La presente invención también contempla los aceites microbianos en los que uno o más ácidos grasos poli-insaturados está presente.

15 Los ácidos grasos poli-insaturados que tal vez estén presentes en el aceite microbiano de la invención son los ácidos grasos poli-insaturados C20  $\omega$ -3 y C18, C20 y C22  $\omega$ -6. En particular estos incluyen ácido  $\gamma$ -linoleico (GLA), ácido dihomo- $\gamma$ -linoleico (DLA), ácido araquidónico (ARA), ácido eicosapentanoico (EPA), y ácido docosahexanoico (DHA).

20 La biomasa microbiana a partir de la cual se obtiene el aceite de la invención puede comprender, u originar, cualquier tipo de microorganismo capaz de producir un aceite que contiene PUFA, por ejemplo una bacteria, una levadura, un hongo o un alga (o una mezcla de las mismas).

25 Por ejemplo, el aceite de la invención puede comprender ácido docosahexanoico (DHA) preferiblemente obtenido de algas u hongos. Las algas incluyen dinoflagelatos (por ejemplo aquellos del género) *Cryptocodinium*. Los hongos pueden ser del género *Mucorales*, por ejemplo *Thraustochytrium*, ácido  $\gamma$ -linoleico (GLA), dihomo- $\gamma$ -linoleico o ácido araquidónico (ARA) preferiblemente obtenido de hongos, tales como *Mortierella*, *Pythium* o *Entomophthora*, o un aceite que contiene ácido eicosapentanoico (EPA), preferiblemente aislado de algas, tal como *Porphyridium* o *Nitzschia*. Típicamente, los aceites obtenidos de estos organismos predominantemente contienen un ácido graso poli-insaturado particular. Sin embargo, ellos pueden adicionalmente contener otros ácidos grasos poli-insaturados en menores cantidades.

30 La presente invención también se refiere a un método de aislar el aceite que contiene ácido graso poli-insaturado del primer aspecto de la invención a partir de biomasa microbiana; aquí la biomasa microbiana puede ser pre-tratada antes de la extracción del aceite. Debido a las relativamente benignas condiciones de los procesos de pre-tratamiento, los ácidos grasos poli-insaturados sensibles a la oxidación y al calor, presentes en el aceite pueden no estar expuestos a condiciones que provoquen degradación.

35 Así, de acuerdo a un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un proceso para obtener un aceite que comprende al menos un ácido graso poli-insaturado (PUFA) a partir de una biomasa microbiana (que comprende organismos que han producido el PUFA), el proceso comprendiendo:

- 40 a) proporcionar, u obtener, una biomasa con un contenido de materia seca de desde 25 a 80%;
- b) granular la biomasa en partículas granulares;
- 45 c) secar las partículas granulares para dar gránulos secos; y
- d) extraer o aislar del aceite de los gránulos secos.

50 Preferiblemente, la forma granular particulada tiene un contenido de materia seca promedio de desde 30 a 70%. Los gránulos secos que resultan de (c) apropiadamente tienen un promedio de contenido de materia seca de al menos 80%.

En un tercer aspecto se proporciona un proceso para el aislamiento de uno o más compuestos a partir de biomasa microbiana, el proceso comprendiendo:

- 55 a) cultivar los microorganismos en un caldo de fermentación bajo condiciones donde el compuesto es producido (por el microorganismo);
- b) pasteurizar tanto el caldo de fermentación o una biomasa microbiana derivada del caldo; y
- 60 c) extraer, aislar o recuperar el compuesto de la biomasa microbiana.

La pasteurización en (b) es pretendida para al menos inactivar parcialmente uno o más sustancias que degradan los compuestos que pueden estar presentes en la biomasa o el caldo. Tales sustancias pueden incluir proteínas, tales como enzimas (por ejemplo, proteasas). En particular, se aspira a al menos inactivar parcialmente las lipasas, fosfolipasas y/o lipoxigenasas.

El compuesto preferiblemente comprende un triglicérido, tal como uno de los PUFAs mencionados previamente.

## ES 2 267 137 T3

La pasteurización usualmente terminará la fermentación. Preferiblemente, esta pasteurización tiene lugar antes de cualquier granulación (o desmenuzamiento o amasado). De manera apropiada, la pasteurización es llevada a cabo en el caldo de fermentación, aunque esta puede ser realizada en la biomasa microbiana obtenida a partir del caldo.

5 Mediante la pasteurización se piensa que al menos algunas de las sustancias que pueden provocar la degradación del compuesto (tal como un PUFA) puedan ser evitadas. La pasteurización puede al menos contribuir a la alta calidad de los PUFAs que pueden ser obtenidos por la presente invención.

10 Así, la pasteurización puede ser ventajosa debido no solamente a que puede matar los microorganismos, sino de manera más importante porque puede inactivar una o más enzimas que pueden afectar adversamente el compuesto. Por ejemplo, la pasteurización puede inactivar varias lipasas, y estas pueden desprender los ácidos grasos de una columna vertebral de triglicérido. Esto es una desventaja para los PUFAs donde un alto contenido de triglicérido es preferido.

15 Después de la pasteurización, pero antes de la extracción (c), se puede realizar la granulación (para dar partículas granulares) y secar las partículas granulares como se describió anteriormente en las etapas (b) y (c) en el segundo aspecto de la invención. Características preferidas de un aspecto particular de la invención son igualmente aplicables, cuando sea apropiado, a otros aspectos.

20 En el proceso de la invención, el microorganismo es primero fermentado bajo condiciones que permitan la producción del ácido o los ácidos grasos poli-insaturados a ser producidos. Tales procesos de fermentación son bien conocidos en el arte: el microorganismo es usualmente alimentado con una fuente de nitrógeno y carbono, conjuntamente con un número de sustancias o productos químicos adicionales que permiten el crecimiento del microorganismo y/o la producción de PUFA. Condiciones de fermentación apropiadas son presentadas en el Ejemplo 22.

25 El material resultante de la fermentación (el cual es a menudo llamado caldo) puede ser luego filtrado, o tratado de otra manera para eliminar al menos parte del componente acuoso. Apropiadamente una gran proporción de agua es eliminada, para obtener una torta de biomasa. La biomasa en esta etapa preferiblemente tiene un contenido de materia seca de desde 25 a 80%. La biomasa puede ser entonces granulada en partículas granulares. Esto es preferiblemente logrado por extrusión. Sin embargo, cualquiera que sea la técnica de granulación seleccionada, es preferible que  
30 la rotura de la célula sea prevenida o minimizada. Las partículas granulares pueden luego ser secadas. Los gránulos pueden incrementar significativamente la eficiencia del paso de secado subsiguiente. Los gránulos resultantes (secados) son entonces particularmente apropiados para la extracción por inmersión o percolación. Los tamaños de las partículas de los gránulos pueden ser ajustados para un secado óptimo y adiciones para la extracción.

35 Las condiciones de granulación (tales como aquellas de un proceso de extrusión) son preferiblemente seleccionadas de manera de que las mismas minimicen la rotura de la célula microbiana). Esto puede aumentar la resistencia a la degradación ya que la no rotura de la célula es a menudo la mejor forma de protección contra la degradación oxidativa del ácido graso poli-insaturado localizado intracelularmente.

40 Preferiblemente, el PUFA es extraído a partir de gránulos secados usando un solvente. Cualquier solvente apropiado conocido por una persona versada en el arte puede ser empleado. Sin embargo, de manera adecuada un solvente no polar es usado, por ejemplo un alcano C<sub>1-6</sub>, por ejemplo hexano. También es posible usar solventes en un estado super crítico, por ejemplo dióxido de carbono líquido.

45 El proceso de la invención puede permitir un costo efectivo y una extracción eficiente del aceite PUFA, y proporcionar un aceite de una calidad particularmente alta. Por ejemplo, la forma granular secada (de la biomasa) permite usar el proceso de extracción por percolación, el cual es particularmente eficiente. En adición, los gránulos permiten el uso de una temperatura relativamente baja para la extracción, la cual no necesariamente disminuye el rendimiento del PUFA. Además, los gránulos secos pueden requerir cantidades reducidas de solvente para el proceso de extrac-  
50 ción. Una ventaja adicional es que la liberación del solvente usado a partir de la biomasa puede ser lograda más eficientemente (este proceso es a menudo referido como tostadura para eliminación del solvente).

El residuo resultante después de la extracción (solvente) (e incluso después de la tostadura para eliminación del solvente) puede ser usado como un alimento o un componente alimenticio (tal como para animales).

55 El PUFA (aceite) que ha sido extraído puede ser usado en ese estado sin procesamiento adicional, o puede ser sometido a uno o más pasos de refinación adicionales. Ya que el aceite PUFA que es extraído de los gránulos secados es de una calidad relativamente alta, cualquier refinación subsiguiente que sea necesaria no solamente se hace más fácil, sino que puede ser minimizada. La refinación del aceite puede ser realizada usando técnicas estándares. Por ejemplo,  
60 el aceite puede ser sometido a desgomado, des-acidificación, decoloración y/o desodorización. El aceite que contiene PUFA de la presente invención tiene un contenido de triglicérido de 93% a 97%. Es particularmente apropiado para propósitos nutricionales. Puede por lo tanto ser adicionado a alimentos (también al alimento final o adicionado durante la preparación del alimento). Puede servir como suplemento nutricional, por ejemplo si se encapsula en cápsulas apropiadas, por ejemplo una cápsula de gelatina. El aceite PUFA puede por lo tanto ser usado en composiciones  
65 alimenticias para humanos y animales. Ejemplos incluyen leche, bebidas naturales, y pan. Los aceites de la invención son particularmente apropiados para incluir en preparados para lactantes. Además, los aceites pueden ser usados en cosméticos.

Un tercer aspecto de la invención se relaciona por lo tanto con una composición que comprende el aceite microbiano del primer aspecto. Esta composición puede ser una comida o alimento o un suplemento nutricional para humanos y/o animales. Tal composición, si es una composición alimenticia, es preferiblemente un preparado para lactante. Alternativamente, puede ser una composición cosmética.

Usando los gránulos secados de la biomasa puede ser logrado un mayor rendimiento que el esperado del compuesto a ser aislado. Se piensa que esto se debe a la estructura de los gránulos los cuales pueden maximizar el acceso al solvente a ser usado para la extracción. Por supuesto, si las partículas son demasiado grandes, entonces el área de superficie puede ser inferior, resultando en un rendimiento correspondientemente inferior. Sin embargo, las partículas no deben ser demasiado pequeñas ya que las mismas pudieran obstaculizar el filtro que es usado durante la extracción. Por esta razón, el proceso de la invención no incluye un paso o etapas de molido, descascarado o trituración.

El contenido de agua en las varias etapas puede también influenciar los rendimientos. Con un contenido de materia seca demasiado alto, la biomasa se desmenuza y puede formar granos finos o polvo, lo que es desventajoso si es empleado un método de extracción por filtración. Sin embargo, con un contenido de agua demasiado alto se obtiene una pasta aguada que es demasiado húmeda para hacerla gránulos.

Procesos para la granulación de materia son conocidos en el arte. Sin embargo, ellos son a menudo combinados con el molido o descascarado en alguna etapa, que provocan las desventajas discutidas anteriormente. En la presente invención, son los gránulos secados los que son usados para la extracción del compuesto, y no una forma molida o descascarada. En adición, por granulación, los daños a las células en la biomasa pueden ser minimizados, lo que nuevamente puede ayudar a aumentar los rendimientos del compuesto. En US 5,340,590 la extrusión de una biomasa es divulgada, pero aquí la forma extraída es usada como un alimento animal: no se apreció de que la forma granular da altos rendimientos en la extracción de un compuesto particular a partir de esa forma granular.

Procesando la biomasa en partículas granulares, se puede ayudar al proceso de secado. El secado puede ser considerablemente más fácil y más eficiente después de que la biomasa ha sido procesada en forma granular.

En adición, ha sido encontrado que los gránulos secados son particularmente estables, especialmente a temperatura ambiente. La biomasa puede ser almacenada durante un tiempo considerable en esta forma, sin degradación. Aunque no se desea estar atado por esta teoría, se sospecha que esto ocurre debido a que el compuesto está localizado dentro de los gránulos y por lo tanto al menos parcialmente protegido del ambiente, el cual puede, para algunos compuestos, causar la degradación por oxidación.

Ha sido encontrado que los gránulos secos son una forma particularmente estable de biomasa. Ellos pueden ser almacenados por semanas, si no años (por ejemplo a temperatura ambiente), con poca o ninguna degradación o cambios en sus propiedades. Esto significa que el (los) compuesto(s) que lo contiene(n) puede ser también establemente almacenado (o incluso transportado). Además, puede ser almacenado a temperatura ambiente, lo que evita la necesidad de congelación, o almacenar a temperaturas particularmente bajas, que es el caso de los materiales de biomasa del arte anterior. Claramente, tal estabilidad es ventajosa ya que las condiciones de almacenamiento son considerablemente costosas.

El método preferido de granular la biomasa es por extrusión. Este puede minimizar la destrucción de las células. Ha sido encontrado que la estabilidad de la biomasa es mejor con una ruptura mínima de las células, en otras palabras el proceso de la invención puede ser adaptado para optimizar el número de células que permanecen intactas. Esto está en contraste con muchas extracciones del arte previo, donde las células son rotas para aislar el compuesto.

Un proceso que puede ser usado con la presente invención se relaciona con el aislamiento de uno o más PUFAS de los gránulos de la biomasa, el proceso comprendiendo:

a) proporcionar gránulos secos que tienen un contenido de materia seca de al menos 80%, los gránulos habiendo sido derivados de una biomasa microbiana que comprende microorganismos que han producido PUFA; y

b) extraer o aislar el o cada PUFA de los gránulos secos por extracción por solvente.

El método de extracción preferido es emplear un solvente, en el que el compuesto es apropiadamente soluble. El método de extracción preferido es usar la percolación: aquí el solvente puede ser pasado encima de un lecho de gránulos. Para esta técnica será apreciado que las partículas no deben ser demasiado pequeñas (por ejemplo las mismas no deben molidas o trituradas) ya que se pudiera obtener demasiado "polvo" (o granos finos) que obstaculizarían el filtro. Las partículas más grandes tienen que ser también evitadas, pero entre esos dos extremos se pueden obtener un área de superficie óptima, de manera que preferiblemente los gránulos sean más grandes que los poros del filtro. Las partículas son preferiblemente altamente porosas para permitir acceder fácilmente el solvente al compuesto a ser extraído.

El pre-tratamiento de la torta de biomasa microbiana para formar las partículas granulares puede mejorar significativamente los procesos de secado subsiguientes. La biomasa granulada secada resultante puede ser particularmente apropiada para la extracción por inmersión o percolación. El tamaño de partícula puede ser especialmente ajustado

## ES 2 267 137 T3

para condiciones de extracción y secado óptimas. Usando biomasa pre-tratada de acuerdo a la invención, el compuesto deseado es ventajosamente extraído sin necesidad de romper las células antes de la extracción.

El proceso de la invención puede ser usado para preparar partículas granulares o gránulos secados de casi cualquier tipo de microorganismo. El microorganismo puede estar en una forma filamentososa, como un hongo o ciertas bacterias, o como células simples, como levaduras, algas y bacterias. Así, la biomasa puede comprender microorganismos que son levaduras, hongos, bacterias o algas. Hongos preferidos son los del orden de *Mucorales*. Por ejemplo, el hongo puede ser del género *Mortierella*, *Phycomyces*, *Blakeslea*, o *Aspergillus*. Hongos preferidos son de las especies *Mortierella alpina*, *Blakeslea trispora*, y *Aspergillus terreus*.

En cuanto a lo que levadura se refiere, estas son preferiblemente del género de *Pichia*, tal como de las especies *Pichia ciferrii*.

La bacteria puede ser del género *Propionibacterium*.

Si la biomasa comprende un alga, ésta es preferiblemente un dinoflagelao y/o pertenece al género de *Cryptocodinium*. Algas preferidas son de las especies de *Cryptocodinium cohnii*.

El compuesto a ser aislado de la biomasa microbiana preparada de acuerdo a la invención puede estar localizado intracelularmente, asociado con la membrana celular o la pared celular, o producido extracelularmente (puede entonces ser insoluble en agua).

El compuesto a ser aislado puede ser hidrofílico o hidrofóbico (por ejemplo lipofílico). Ejemplos de tales compuestos son las enzimas o proteínas intracelulares, lípidos, metabolitos secundarios como vitaminas (por ejemplo vitamina B<sub>12</sub>), antibióticos polieno o macrólidos, sustancias que proporcionan sabor o carotenoides. Preferiblemente, el compuesto a ser aislado de la biomasa microbiana es un compuesto lipofílico.

El compuesto extraído de la biomasa tratada de acuerdo a la invención puede ser de alta calidad ya que éste ha sido sometido a un pequeño deterioro, si es que existe, debido a las condiciones benignas usadas en el proceso de tratamiento. Por lo tanto, la invención es particularmente apropiada para la preparación de biomasa microbiana de la cual compuestos sensibles al calor o la oxidación necesitan ser aislados.

El segundo aspecto de la invención es apropiado para preparar biomasa microbiana para el aislamiento de compuestos que tienen un grado de instauración, tal como lípidos que contienen ácidos grasos poli-insaturados (PUFA). Preferiblemente el PUFA es un ácido graso poli-insaturado C18, C20 o C22  $\omega$ -3 o  $\omega$ -6. Por ejemplo el compuesto puede ser ácido docosahexanoico (DHA) (de algas u hongos, tal como dinoflagelato *Cryptocodinium* o del hongo *Thraustochytrium*), ácido  $\gamma$ -linoleico (GLA), dihomo- $\gamma$ -linoleico- o ácido araquidónico (ARA) (de hongos, tal como *Mortierella*, *Pythium* o *Entomophthora*), o ácido eicosapentanoico (EPA) (de algas, tal como *Porphyridium* o *Nitzschia*). Cualquiera de estos PUFA puede ser aislado en su forma propia o, más usualmente, en forma de un lípido.

Ejemplos adicionales de compuestos que pueden ser aislados incluyen  $\beta$ -caroteno, tal como de géneros de hongo por ejemplo del orden de *Mucorales*, por ejemplo *Phycomyces* o *Blakeslea*, astaxantina de la levadura *Phaffia rhodozyma*, tetraacetil-fitosfingosina (TAPS) de la levadura *Pichia ciferrii*, y/o vitamina B12 de la bacteria propiónica.

Otros compuestos que pueden ser extraídos incluyen los lipofílicos/no polares tal como la lovastatina, ciclosporina y laidlomocina. De éstas, las primeras dos son producidas extra-celularmente o unidas a la pared celular. Solventes apropiados, por lo tanto, incluyen el heptano, hexano, acetona, metanol y tolueno, y etanol. Sin embargo, para los dos últimos compuestos, se puede usar el isopropil alcohol o butil acetato para la ciclosporina, y el etanol o metanol para la laidlomocina. Generalmente hablando, el hexano es apropiado para antibióticos solubles, tales como aquellos producidos por los organismos del género de *Streptomyces*.

Otros compuestos incluyen policétidos, o metabolitos derivados de los policétidos, los que incluyen muchos antibióticos. Los policétidos preferidos son aquellos que no contienen nitrógeno, y pueden ser aromáticos, preferiblemente conteniendo al menos un anillo de 6 miembros. Policétidos preferidos son las estatinas, las cuales incluyen la lovastatina, simvastatina, pravastatina y compactita. Otros compuestos preferidos son los inhibidores de HMG-CoA reductasa. Estos pueden reducir los niveles de colesterol en la sangre.

Otras clases de compuestos que pueden ser extraídos incluyen esteroides y esteroles tal como el ergosterol. Estos son producidos por levaduras y mohos.

Los compuestos aislados de acuerdo a las composiciones del proceso de la invención son apropiados para uso en alimentos animales y humanos (por ejemplo en preparados para lactante) u otras composiciones comestibles y en cosméticos, composiciones naturales o suplementos, o composiciones farmacéuticas.

En el proceso de la invención, el microorganismo de selección puede ser primero fermentado para obtener una suficiente cantidad de biomasa para la extracción subsiguiente del compuesto. Las condiciones de fermentación dependerán del organismo usado, y pueden ser optimizadas para un alto contenido del compuesto en la biomasa resultante.

## ES 2 267 137 T3

Después que el proceso de fermentación ha terminado, el caldo de fermentación, dependiendo del tipo de compuesto a ser aislado, puede ser pasteurizado para matar el organismo de producción e inactivar cualquier enzima indeseable. Si se desea, agentes de floculación y/o otros ayudantes del proceso pueden ser adicionados al caldo para mejorar su capacidad de filtración.

5

Los agentes de floculación apropiados incluyen  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  y poliamidas catiónicas polares. Estos pueden estar presentes desde 0.1 a 2% en peso.

10

Preferiblemente la biomasa (o el caldo) es pasteurizado. Después de la fermentación la pasterización puede ser necesaria para obtener una pasta aguada que puede ser procesada de manera higiénica. La pasteurización de la biomasa en el fermentador puede tener varias ventajas. Primero, el organismo de producción no está expuesto al medio ambiente. Además, actividades enzimáticas indeseadas, que influyen la calidad del compuesto diana pueden ser inactivadas.

15

En dependencia de las especies del organismo de producción la pasteurización es realizada a temperaturas de desde 60 a 100°C. La pasteurización puede ser realizada por calentamiento (directamente) con vapor en el fermentador o por (indirecto) calentamiento usando un medio por vía de intercambiadores de calor, tanto a través de la pared o con serpentines refrigerantes o un intercambiador de calor externo tal como intercambiadores de calor de platos conocidos u otros intercambiadores de calor apropiados.

20

Las condiciones de pasteurización preferidas siguientes pueden ser empleadas, especialmente para organismos del género *Mortierella*.

25

El caldo de fermentación (o biomasa) es pasteurizado para matar el microorganismo e inactivar la actividad de la enzima. Esto puede ser alrededor de 144 horas después de la inoculación del fermentador principal. La biomasa (o caldo) es pasteurizado apropiadamente desde 50 a 95°C, preferiblemente desde 60 a 75°C, y óptimamente entre 63 y 68°C. Esto puede ser por desde 30 a 90 minutos, preferiblemente desde 50 a 75 minutos, óptimamente, desde 55 a 65 minutos. Esto puede ser por cualquier medio de calentamiento apropiado, pero es preferiblemente por inyección de vapor directo, tal como en el recipiente de fermentación principal.

30

Después de la pasteurización el caldo se deja enfriar, o es enfriado. Esto puede tonar alrededor de 4 horas, apropiadamente a alrededor de 25°C.

35

Si dos o más organismos están involucrados, de caldos de fermentación o biomasa diferentes, entonces cada biomasa (o caldo) puede ser individualmente pasteurizado o, después de mezclar, ellos pueden ser pasteurizados. Sin embargo, el primero es preferido ya que pueden entonces ser empleadas condiciones de pasteurización diferentes para los organismos diferentes.

40

Usualmente, la pasteurización tendrá lugar en el recipiente de fermentación en el cual la fermentación ha ocurrido. Sin embargo, para algunos organismos (tal como bacterias) es a menudo preferido eliminar los microorganismos del recipiente primero, y luego pasteurizar (por ejemplo, antes del secado por atomización en un proceso de granulación aglomeración).

45

Como habría sido apreciado, la pasteurización usualmente mataría la mayoría, si no todos, los microorganismos. Por lo tanto, en los gránulos secados, al menos 95%, tal como al menos 98%, si no 95%, de los microorganismos, han sido matados (es decir no están vivos)

Para algunos organismos (por ejemplo *Pichia*) preferiblemente la pasteurización no es llevada a cabo.

50

Para prevenir la recontaminación de la biomasa pasteurizada durante los pasos de procesamiento subsiguientes pueden ser designadas condiciones para reducir el riesgo de crecimiento. Una posibilidad es acidificar el caldo con un ácido apropiado. Para prevenir el sobre-crecimiento de muchas especies microbianas es suficiente un rango de pH de desde 3 a 4 en combinación con una baja temperatura del proceso.

55

También otros agentes bio-estáticos como los alcoholes, sorbatos, etc. pueden ser usados para este propósito.

Para productos térmicamente estables un procesamiento a altas temperaturas (60-100°C) puede ser aplicado.

60

Preferiblemente condiciones de acidificación (por ejemplo para organismos del género de *Mortierella*) son como sigue.

El pH del caldo pasteurizado es ajustado desde 2 a 5 para mejorar la estabilidad microbiana, preferiblemente a un pH en el rango de 3 a 4, y óptimamente a pH de alrededor de 3.5.

65

La acidificación del caldo (antes o después de la pasteurización) puede tener ventajas adicionales. Si el compuesto es un policétido, por ejemplo una estatina, entonces la acidificación puede provocar la precipitación del compuesto. Para muchos compuestos, especialmente aquellos solubles en agua, la precipitación antes de los pasos de procesamiento es deseable, no sea que el compuesto se pierda cuando el caldo sea filtrado para eliminar el agua. Por lo tanto, antes

## ES 2 267 137 T3

o después de la pasteurización, un compuesto puede ser precipitado (tal como por acidificación, aunque cualquier otro medio conocido por una persona versada en el arte puede ser empleado).

5 El pH puede ser ajustado por cualquier medio apropiado por ejemplo con ácido fosfórico al 85%, preferiblemente ácido fosfórico diluido al 55% y óptimamente con ácido fosfórico diluido al 33%.

En esta etapa se tiene el caldo, que puede haber sido pasteurizado. La próxima etapa es obtener una biomasa, separando los microorganismos del medio circundante.

10 Una técnica de separación sólido-líquido puede ser realizada para separar la biomasa del caldo de fermentación. Esta biomasa (cosechada) usualmente tiene un contenido de materia seca que varía desde 20 a 35%, dependiendo del tipo de microorganismo. Sin embargo, para la extrusión (y subsiguiente secado) la biomasa típicamente debería tener un contenido de materia seca que oscila desde 25% a 80%.

15 Si el contenido de agua de la biomasa es demasiado alto (por ejemplo para la extrusión y/o el subsiguiente secado), ésta puede ser deshidratada y/o tener su contenido de materia seca aumentado. Esto puede ser logrado por un número de métodos. Primero, la biomasa puede ser sometida a deshidratación (adicional). Cualquier método de deshidratación conocido por una persona versada en el arte puede ser usado; el contenido de materia seca deseado puede ser desde 25 o 30 a 80%.

20 Preferiblemente, un método de deshidratación mecánico es usado. El máximo contenido de materia seca que puede ser alcanzado por la deshidratación mecánica variará, sin embargo, en dependencia del tipo de microorganismo. Para ciertos microorganismos, por ejemplo levaduras, el contenido de materia seca de la biomasa después de la deshidratación mecánica pudiera no exceder un nivel de 35 a 40%, mientras que el mismo proceso ejecutado en la biomasa de ciertos microorganismos ricos en lípidos puede resultar en un mayor contenido de materia seca de desde 45 a 60%.

Un método preferido es usar un filtro prensa de membrana (filtro prensa de marco y plato con membranas de compresión) que pueden combinar la separación sólido-líquido con la deshidratación mecánica y es especialmente apropiado para obtener el contenido de materia seca deseado.

30 Alternativamente o en adición, el contenido de materia seca deseado de la biomasa microbiana puede ser aumentado por la adición de agentes de incremento de la consistencia (o seco). Estos agentes de incremento de la consistencia están apropiadamente secos y, preferiblemente, no interfieren negativamente con el proceso de extracción y/o las propiedades del compuesto. Por ejemplo, los agentes de incremento de la consistencia pueden comprender almidón y/o fibras de plantas como avena o salvado de trigo o celulosa. Incluso otras biomásas (de un menor contenido de agua) pueden ser usadas. Tales sustancias pueden ser adicionadas de cualquier manera, si esto mejora la capacidad de extrusión.

40 Algunas veces, por ejemplo después de la separación sólido-líquido y/o la deshidratación mecánica, la biomasa puede formar grandes tortas. Esto pudiera no ser apropiado para la granulación (por ejemplo por extrusión). Para reducir la biomasa a un tamaño que pueda permitir la granulación (por ejemplo la alimentación eficiente en la extrusora), la biomasa es apropiadamente desmenuzada, amasada y/o mezclada. Este desmenuzamiento y/o amasado puede ser logrado por tratamiento (corto) en un mezclador de alto corte. Opcionalmente, el o cada agente de incremento de la consistencia puede ser adicionado durante esta parte del proceso.

45 La biomasa (opcionalmente desmenuzada o amasada) puede ser subsiguientemente sometida al proceso de granulación para resultar en la formación de partículas granulares. La granulación puede ser efectuada en un número de formas diferentes.

50 Otro método de reducir el contenido de agua (o aumentar el contenido de materia seca) es usar un lavado con sal (por ejemplo salmuera), tanto de la biomasa o (preferiblemente) después de la separación de la biomasa del caldo, tal como usando filtración con lavado.

55 En una realización preferida de la invención, el tamaño y la estructura de partícula deseada es obtenido por un proceso de extrusión. Las características de las partículas, tal como la estructura y el tamaño, puede ser importante para optimizar el proceso de extracción y/o el secado. Durante el paso de secado, si las partículas son demasiado pequeñas ellas pueden causar problemas ya que pueden generar polvo y granos finos, mientras que partículas demasiado grandes no fluidizan y provocan un pobre rendimiento de secado. Durante la extracción, un tamaño de gránulo demasiado pequeño puede no permitir el uso de un proceso de percolación, ya que la caída de presión sobre el lecho de biomasa será demasiado alta. Demasiados granos finos pueden dar problemas en los pasos de purificación subsiguientes. Un tamaño demasiado grande puede impedir la penetración eficiente del solvente durante la extracción. Además, la estructura de la partícula deberá ser suficientemente compacta para prevenir la desintegración durante el secado y la extracción, pero las partículas (gránulos secados) preferiblemente tienen una porosidad que permite la penetración (eficiente) del solvente durante la extracción.

65 Las condiciones de extrusión pueden ser ajustadas por una persona versada en el arte para obtener partículas (biomasa) granular que tenga el tamaño y la estructura deseada.

## ES 2 267 137 T3

Las condiciones de extrusión pueden ser ajustadas para minimizar la ruptura de la célula. La ruptura mínima de la célula asegura una protección óptima de los compuestos sensibles a la oxidación, lábiles contra la degradación inducida por la oxidación. La extrusión es por lo tanto preferiblemente conducida a temperaturas inferiores, sin ningún medio de calentamiento. Preferiblemente la misma está en el rango de desde 20 a 30°C, tal como la temperatura ambiente.

5 Durante la extrusión las partículas granulares pueden formar de manera natural, el “extrudido” cayendo por su propio peso desde la hilera de estirar por la influencia de la gravedad, formando partículas. Si, no obstante, la biomasa es de una naturaleza donde después de ser extrudida por la hilera de estirar en formas de hebras largas como espaguetis, entonces el espagueti puede ser cortado para dar partículas de un tamaño deseado.

10 Ha sido encontrado que la temperatura de la biomasa influencia la naturaleza de las partículas granulares producidas en extrusión. Preferiblemente la biomasa tiene una temperatura de desde 6 a 15°C antes de la extrusión. Sin embargo, en la extrusora la temperatura de la biomasa puede elevarse para estar desde 10 a 60°C, aunque preferiblemente esta está entre 15 y 30°C. La elevación de la temperatura dependerá de la presión ejercida en la biomasa, y su contenido de materia seca.

15 Durante la extrusión la biomasa es usualmente forzada a través de un cilindro hacia la hilera de estirar, a menudo mediante un tornillo. Este cilindro preferiblemente no es calentado. De hecho, es ventajoso que sea enfriado. Apropiadamente, la temperatura del refrigerante (por ejemplo una solución acuosa tal como agua) es desde 1 a 4°C, tal como alrededor de 2°C.

20 Generalmente hablando, la extrusión no cambia el contenido de agua. Este es el por qué en la etapa (b), el contenido de materia seca es el mismo que en la etapa (a). Sin embargo, como será apreciado, otras técnicas de granulación (tal como aquellas descritas después) cambian el contenido de agua, y pueden disminuirlo (en otras palabras, aumentan el contenido de materia seca). Para una biomasa que contiene hongos, por ejemplo, del orden de Mucorales (en particular uno que produce un PUFA) el contenido de materia seca de la biomasa en (a), el cual usualmente será el mismo que en las partículas granulares producidas en la granulación (en este caso la extrusión) está apropiadamente entre 35 y 60%, preferiblemente desde 50 a 60%. Después del secado, los gránulos secados preferiblemente tienen un contenido de materia seca de al menos 90%, tal como al menos 95%.

30 La técnica de granulación preferida es usar una extrusora. Una buena panorámica de las extrusoras es de W. Pietsch (“Agrandamiento del Tamaño por Aglomeración”: Wiley & Sons 1991, página 385). La máquina puede ser una extrusora continua o discontinua. Para las extrusoras continuas debe ser mencionado las extrusoras de tornillo simple único (con transporte axial y radial). También hay extrusoras de tornillo doble de co- o de contra rotación. La biomasa a ser extraída es transportada, parcialmente compactada y presionada a través de una hilera (de estirar)

35 perforada. Otro grupo de extrusoras incluye máquinas formadoras de aglomerados. Aquí una herramienta de presión cilíndrica rueda sobre una capa de material depositada sobre una hilera perforada.

Si los gránulos son obtenidos por extrusión, entonces la biomasa necesita estar en una forma en que pueda ser extrudida. El contenido de agua puede ser ajustado, si es necesario, dependiendo de la condición de la biomasa, los microorganismos empleados, y las condiciones de extrusión. El agua puede ser eliminada, o el contenido de materia seca aumentado por medio de la adición de sólidos, por ejemplo almidón. La biomasa puede de esta forma ser ajustada para corregir la consistencia, la cual es usualmente aquella de una pasta.

45 Aunque los gránulos pueden ser usados para la extracción del compuesto, los mismos además representan una forma estable de la biomasa que puede ser almacenada. Los gránulos pueden tener otros usos: por ejemplo, pueden ser usados en la preparación de un preparado para lactante, donde la biomasa contiene uno o más ácidos grasos poli-insaturados (PUFAs).

50 La presente invención también apunta a otros métodos de granulación que permiten la formulación de partículas (granulares). Por ejemplo, un proceso de secado multi-etapas puede comprender una combinación de secado por atomización y un lecho fluidizado y también puede dar partículas granulares.

Otros tipos de técnicas de granulación pueden ser empleadas. Generalmente la granulación es la acción de obtener sólidos en una forma granular tanto por agrandamiento del tamaño o reducción del tamaño. En general el agrandamiento del tamaño es empleado. Una buena panorámica del tipo de procesos de granulación disponible es descrita en W. Pietsch “Agrandamiento del Tamaño por Aglomeración” (Wiley & Sons 1991, como anteriormente). Dentro de esto hay muchas técnicas diferentes disponibles para la granulación y estas incluyen muchos métodos de aglomeración, los cuales serán descritos. Aquí la aglomeración resulta en partículas pequeñas que se adhieren unas con otras (aglomeración) para formar partículas más grandes (en este caso las granulares). Por lo tanto, si una primera técnica resulta en partículas que son demasiado pequeñas puede ser empleada una técnica de aglomeración para dar partículas (granulares) más grandes.

65 La aglomeración en tambor es usualmente lograda usando un tambor de rotación y/o de volteo o secador de cono con un polvo que tiene propiedades adhesivas (de manera que las partículas se peguen juntas). En algunos casos un aglomerante adicionado extra puede ser mezclado. Por este mecanismo pueden ser formadas partículas esféricas.

La aglomeración por presión está usualmente caracterizada por grandes fuerzas que actúan sobre una masa de una materia particulada. En general este proceso es realizado con materiales plásticos (no elásticos) o polvos finos. Este

proceso es normalmente usado para materiales en polvo. (Sin embargo es también usado en la producción de levadura seca para pastas de una cierta consistencia). Las partículas conformadas pueden ser secadas hasta un contenido de materia seca apropiado para un almacenaje óptimo. La aglomeración por presión puede ser llevada a cabo por un pistón, rodillo, isostático y/o prensas extrusoras. Una buena descripción de este tipo de equipo es dada en el libro de Pietsch anteriormente mencionado.

Las prensas de extrusión usualmente hacen uso de fricción con la pared, provocando resistencia al flujo del material plástico a través de perforaciones o troqueles finales abiertos. Particularmente en extrusoras de tornillo un mezclado extensivo tiene lugar y grandes fuerzas de corte son aplicadas.

En general los materiales con bajas temperaturas de fusión o plastificación puede ser directamente aglomerados.

Otras técnicas de aglomeración son posibles. Por ejemplo, el secado por atomización en combinación con un aglomerante de lecho fluidizado. Inicialmente la biomasa puede ser secada por atomización a través de una boquilla o usando una rueda rotatoria en un secador de atomización. Las partículas finas son recicladas a la sección de atomización. El polvo pegado resultante es adicionalmente aglomerado en una sección de lecho fluidizado. En algunos casos rehumedecer el polvo puede mejorar el proceso de aglomeración, esta técnica descrita es conocida por secado multi-etapa.

Para describir el secado multi-etapa con más detalles, la biomasa es primero secada por atomización. Esto puede dar un polvo fino. La temperatura de secado por atomización (temperatura de entrada del aire) es usualmente desde 160°C a 260°C y/o la temperatura de salida del aire es desde 75 a 90°C. Aquí la biomasa es atomizada por un disco de rotación rápida o boquilla que genera pequeñas partículas. Las partículas pueden luego caer, por gravedad, hacia el fondo de una torre de secado por atomización. Aquí, un lecho fluidizado puede ser proporcionado, el cual puede usar aire caliente para efectuar el secado (apropiado a 90 hasta 95°C). Aquí, la aglomeración puede tener lugar, y las partículas pueden pegarse juntas. A continuación de esto, las partículas (granulares) aglomeradas son sometidas a secado, por ejemplo sobre un lecho de secado de correa o un lecho sub-fluidizado. Al inicio del proceso, una biomasa puede tener un contenido de materia seca por debajo de 30%. Después del secado por atomización, este puede aumentar a desde 75 a 90%, y después de la aglomeración puede ser desde 90 a 95%. Después del secado, este puede aumentar hasta al menos 95%.

Otra técnica es usar un aglomerador de lecho fluidizado. Aquí el polvo puede ser fluidizado en un flujo de gas. En el lecho de partícula un fluido es atomizado con agua que humedece el polvo y mejora la aglomeración.

En general los procesos de aglomeración descritos son para polvos secos que pueden ser plastificados. Una excepción es el secado en un secador multi-etapa. Esta combinación de secado por atomización en combinación con un lecho fluido después del secador es seguida por la aglomeración de muchos tipos diferentes de biomasa. Sin embargo el proceso no es siempre apropiado para productos termo-lábiles o productos susceptibles a la oxidación por aire (caliente). Una buena vía de producir una biomasa seca granulada es la extrusión de una torta filtrada mecánicamente deshidratada seguido por un paso de secado apropiado como el secado en lecho fluido o sub-fluidizado.

Otra forma de aglomeración de biomasa (seca) puede ser realizada por el re-humedecimiento del producto seco (atomizado) seguido por un paso de extrusión y re-secado en por ejemplo un secador de lecho fluido. Los polvos, con un bajo punto de fusión o una baja temperatura de plastificación (o en caso de ciertas biomasa secas con un alto contenido de aceite intracelular, que se derrite parcialmente debido a las fuerzas en la extrusora) puede ser extraído. Aglomerados apropiadas se forman en la hilera de estirado.

Al igual que arriba en (c), la biomasa granulada (extrudida o de otra forma) puede ser secada, apropiadamente bajo condiciones que permitan que las partículas permanezcan intactas. Se piensa que el tamaño y estructura de la partícula de la biomasa después del proceso de granulación permite el secado eficiente de la biomasa. El secado puede ser realizado usando varios secadores, por ejemplo un secador de correa, un secador de correa al vacío o un vacío, un secador de lecho fluidizado o sub-fluidizado. La persona versada en el arte selecciona entre un proceso continuo o discontinuo.

El uso de un secador de lecho fluidizado o sub-fluidizado es especialmente preferido en el proceso de la invención. El secado ocurre al aire o bajo nitrógeno. Con el secado en lecho fluidizado o sub-fluidizado, la temperatura en el lecho puede ser ajustada a valores preestablecidos. Estos valores pueden oscilar ampliamente, por ejemplo desde 35° a 120°C, tal como 50 a 90°C, opcionalmente desde 60 a 80°C. Si un compuesto lábil necesita ser aislado de la biomasa, la temperatura del proceso de secado puede fácilmente ser ajustada a rangos inferiores, para disminuir el riesgo de oxidación o degradación.

Alternativamente o en adición un proceso de secado al vacío puede ser empleado, por ejemplo desde 1 a 2 horas.

Muchas ventajas pueden obtenerse del paso de secado. Primero, el secado de las partículas de biomasa (para formar gránulos) puede resultar en un material intermedio que puede ser establemente almacenado por un período de tiempo predeterminado. Aquí un alto (relativamente) contenido de materia seca de la biomasa puede prevenir la degradación del compuesto a ser aislado a partir de la biomasa. De esta forma, los gránulos secados pueden ser considerados como una formulación estable del presente compuesto dentro o asociado con la biomasa.

## ES 2 267 137 T3

Por ejemplo, los gránulos pueden funcionar como un portador para una enzima, donde la enzima es inmovilizada dentro de los gránulos mezclando una cantidad apropiada de un agente de retribulación, por ejemplo glutaraldehído, en la biomasa antes de la extrusión.

- 5 En adición, los gránulos secos pueden ser ventajosamente usados como tal, por ejemplo como una composición alimenticia o alimento o aditivo.

Las partículas y/o los gránulos (por ejemplo producidos por extrusión) pueden tener las siguientes propiedades.

- 10 Los gránulos pueden tener la forma de un confeti de chocolate. El diámetro de los gránulos (extrudidos) puede variar desde 0.1 a 12 mm, tal como desde 0.3 a 10 mm. Más preferido es desde 1.5 mm a 6 mm y óptimamente (para la extracción cuando están secos) el diámetro es desde 2 a 3 mm. La longitud de los gránulos puede ser de alrededor de 2 a 5 o 6 veces el diámetro. Los mismos pueden ser entonces fácilmente manipulados para el empaquetado y usados con extractores comercialmente disponibles (para garantizar la permeabilidad del lecho). Usualmente la mayoría, si no sustancialmente todos, los gránulos tendrán el mismo tamaño, efectivamente, se pueden obtener gránulos altamente uniformes u homogéneos donde al menos el 80%, tal como al menos el 90%, de todos los gránulos tienen una propiedad partícula dentro del rango especificado.

- 20 Los gránulos están preferiblemente sueltos. Ellos pueden ser de forma aproximadamente cilíndrica. Esto puede ser logrado usando la extrusión. Las partículas pueden entonces ser de un diámetro que es aproximadamente el mismo (aunque puede ser ligeramente mayor) que el de los orificios de la hilera de estirado usado para la extrusión. Durante este proceso, se pueden formar partículas automáticamente sobre la hilera de estirado existente. En ese caso, la longitud de las partículas será variable. Sin embargo, la longitud de las partículas puede ser influenciada por ejemplo, si se usan medios, por ejemplo un cuchillo (por ejemplo una o más cuchillas rotativas adyacentes a la hilera de estirado) cuando la mayoría de las partículas (si no todas) tendrán sustancialmente la misma longitud. Longitudes preferidas de tales partículas son al menos 2 mm, tal como al menos 3 mm. Aproximadamente los gránulos son de un tamaño y contenido de agua que les permite ser "moldeados" lo que les permite ser almacenados y transportados más fácilmente. Aunque, generalmente hablando, la mayoría de las partículas estarán alargadas en la naturaleza, algunas pueden ser aproximadamente esféricas. El contenido de lípidos preferido de los gránulos está preferiblemente desde 30 a 50% por peso.

La densidad aparente de los gránulos estará usualmente desde 400 a 1100 kg/m<sup>3</sup>.

- 35 Como ha sido discutido, los gránulos son preferiblemente porosos, para permitir el acceso del solvente al compuesto a ser extraído. Preferiblemente, los gránulos tienen canales huecos, y estos pueden extenderse hacia, y en, el centro de los gránulos. El número de canales puede ser desde 40 a 60% tal como desde 45 a 55%, óptimamente alrededor del 50% por volumen de los gránulos es hueco (aire). En lo que respecta a los canales, ellos pueden ser de una longitud de 10 a 20 veces aquella de su diámetro promedio. Los gránulos serán, generalmente hablando, homogéneos en su composición, el exterior del gránulo, será en esencia, del mismo material que el centro. Esto está en contraste con las composiciones de levadura del arte previo las cuales pueden tener una parte exterior relativamente sólida pero un núcleo relativamente de aire.

- Los gránulos pueden ser establemente almacenados a una temperatura óptima para el compuesto a ser eventualmente extraído.

- 45 El contenido de materia seca preferido de los gránulos secados es mayor que 80%, más preferiblemente al menos 85%, lo más preferido al menos 90% y óptimamente en el rango desde 93 a 97%. Si un solvente miscible en agua es usado para la extracción pueden ser usados gránulos con contenidos de materia seca inferiores.

- 50 Los gránulos (secados) son así usualmente porosos de manera que los solventes usados en la extracción puedan ganar fácil acceso a (interior de) los gránulos. Así, durante la extrusión y secado la cantidad de polvo puede ser minimizada (lo que aumenta el rendimiento) y puede evitar una filtración adicional del extracto (solvente) antes de la evaporación del extracto.

- 55 La porosidad de los gránulos es dependiente del contenido de materia seca (o agua) de las partículas granulares. A menudo el agua en las partículas granulares será evaporada con el secado para dejar un poro (hueco). La porosidad de los gránulos secados es preferiblemente desde 15 a 50%, como desde 20 a 40%, óptimamente desde 25 a 35%.

- 60 Preferiblemente la mayoría (si no sustancialmente todas) las células en los gránulos están intactas (es decir no rotas). Los gránulos especialmente de una biomasa fúngica, puede ser completamente partículas de biomasa las que pueden tener un diámetro desde 0.3 a 10 mm, preferiblemente un diámetro de desde 0.7 a 5 mm, opcionalmente desde 1 a 3 mm. Comúnmente, las partículas se formarán automáticamente con una longitud deseada. De otra forma, las partículas pueden ser cortadas a una longitud deseada. Si la granulación fue por extrusión, entonces los orificios en la hilera de estirado de la extrusora puede generalmente corresponder a los diámetros de los gránulos.

- 65 Opcionalmente, antioxidantes pueden ser adicionados antes o durante el proceso de granulación. Estos pueden incluir tocoferol y palmitato ascorbil, por ejemplo presente hasta 0.1% (en peso).

## ES 2 267 137 T3

Un material de biomasa con características que pueden permitir una extracción eficiente y un costo eficiente de compuestos es así proporcionada. El(los) compuesto(s) presentes pueden entonces ser purificados, aislados o (preferiblemente) extraídos. El proceso permite el uso de un proceso de extracción por percolación. La ventaja permitida por este proceso de extracción parece ser debida a la estructura y tamaño así como al alto contenido de materia seca.

5 Un extrudido seco requiere una cantidad reducida de solvente para la extracción del compuesto valioso del mismo. En adición, el proceso de tostadura para eliminación del solvente, es decir, la liberación del solvente usado de la biomasa, puede ser realizado mejor y más eficientemente con biomasa en forma de un extrudido.

10 El residuo extrudido obtenido después del proceso de tostadura para eliminación del solvente puede ventajosamente ser usado como un componente alimenticio.

Un contenido de materia seca del extrudido que exceda 90 a 95% puede permitir un almacenamiento estable del extrudido, mientras que un contenido de materia seca por encima de 85% puede dar una ventaja significativa en el proceso de extracción subsiguiente.

15 La extracción es preferiblemente conducida usando un solvente. El solvente empleado dependerá del compuesto a ser extraído, pero en particular se pueden mencionar los ésteres de alquilo de  $C_{1-10}$  (por ejemplo etil o butil acetato), tolueno, alcoholes de  $C_{1-3}$  (por ejemplo metanol, propanol) y alcanos de  $C_{3-6}$  (por ejemplo hexano) y/o un fluido supercrítico (por ejemplo  $CO_2$  líquido o propano supercrítico). En las técnicas del arte anterior, el solvente ha sido empleado directamente sobre el microorganismo en el caldo. Sin embargo, llevando a cabo la extracción de los gránulos, se puede reducir significativamente la cantidad de solvente requerido. En algunos de los experimentos del solicitante, fue necesario 20 a 30 veces menos solvente para realizar la extracción. No solamente esto resultó en un ahorro económico significativo, debido a que menos solvente es usado, también se minimizan los problemas de emisión. Usando gránulos el área de superficie disponible para el solvente puede ser particularmente mayor y por lo tanto se puede

20 obtener buenos rendimientos.

Si el compuesto a ser extraído es hidrofóbico, entonces un solvente apolar es preferiblemente usado. Para compuestos hidrofílicos, un solvente polar (tal como un alcohol) es apropiadamente empleado.

30 La extracción puede ser efectuada usando una variedad de técnicas. El método preferido es la extracción por percolación, usando un filtro. Aquí, una columna puede ser llenada con gránulos secados. El solvente (hexano) es entonces adicionado para cubrir los gránulos. Aunque el solvente puede ser pasado una vez a través de la columna y sobre los gránulos secados, preferiblemente este es recirculado (como un sistema cerrado o abierto). Apropiadamente el solvente es recirculado de tres a siete veces, tal como alrededor de cinco veces, apropiadamente por un período de tiempo de desde media hora hasta una hora y media tal como una hora. La Figura 3 muestra un aparato de extracción por percolación apropiado. El solvente es mantenido en el recipiente antes de la adición al extractor de percolación que contiene los gránulos. El solvente es circulado por medio de una bomba. El filtro de pulido es pretendido para eliminar los granos finos.

40 Otros extractores de percolación pueden ser empleados. Estos pueden ser de un diseño a contra corriente o de corriente cruzada. En el primero, los gránulos secos pueden ser mantenidos en un cilindro rotatorio (tal como un carrusel) dividido en varios sectores. El solvente es pasado a través de los gránulos en un sector en una dirección, y luego pasado a través (preferiblemente en la misma dirección) de los gránulos en otro sector (tal como uno vecino). Estas máquinas son a menudo referidas como extractores de carrusel y están disponibles por Kripp, Alemania.

45 En otra técnica, los gránulos pueden ser colocados en, por ejemplo, una correa que se mueve (por ejemplo porosa) o transportador que se mueve en una dirección sustancialmente opuesta al solvente. Esto puede significar que los gránulos frescos son extraídos con el solvente que ya ha pasado a través de otros gránulos, y que el solvente fresco es aplicado a los gránulos que han sido previamente sometidos a la extracción con el solvente. Este arreglo maximiza la eficiencia.

50

En una técnica de corriente cruzada lotes separados de gránulos son sometidos a la extracción con porciones de solvente fresco.

55 El proceso puede ser usado para obtener una mezcla de dos o más compuestos a partir de diferentes microorganismos preparando partículas granulares o gránulos a partir de una mezcla de dos o más microorganismos. Esta mezcla de microorganismos puede ser obtenida mezclando los caldos de fermentación de dos o más microorganismos diferentes directamente después de haber terminado o por combinación de la biomasa de dos o más microorganismos inmediatamente antes de la granulación (por ejemplo proceso de extrusión). Es también posible mezclar dos o más extrudidos microbianos diferentes antes del proceso de extracción.

60

Un proceso preferido de acuerdo a la presente invención puede así ser como sigue:

65 a) fermentar uno o más microorganismos en un medio apropiado, bajo condiciones que permitan al microorganismo producir el compuesto deseado, el cual puede resultar en un caldo (de microorganismos en el medio circundante);

b) si es necesario, precipitar o solidificar el compuesto, tal como por acidificación;

## ES 2 267 137 T3

- c) separar los microorganismos del medio en el caldo, lo que puede ser logrado por la separación sólido/líquido, tal como por filtración, para obtener una biomasa;
- d) pasteurización, del caldo resultante de (a) o de la biomasa resultante de (c);
- e) si es necesario, aumentar el contenido de materia seca de la biomasa, por ejemplo adicionando materia seca o sustancias, o por disminución del contenido de agua, por ejemplo por una deshidratación o técnica de secado;
- f) desmenuzar y/o amasar la biomasa resultante (y, opcionalmente, aumentar el contenido de materia seca adicionando uno o más sustancias secantes);
- g) granular la biomasa para dar partículas granulares, tal como por extrusión;
- h) secar las partículas granulares para dar gránulos secados; y
- i) extraer uno o más de los compuestos, usando un solvente apropiado.

Los compuestos aislados pueden ser de alta calidad y pueden ser apropiados para uso en la nutrición humana o animal. Especialmente los lípidos que contienen ácidos grasos poli-insaturados (PUFA) aislados son apropiados para propósitos nutricionales, en particular para la incorporación en preparados para lactantes.

La invención será ahora descrita, por medio de ejemplos, con relación a los siguientes Ejemplos los cuales son proporcionados a modo de ilustración. Estos son acompañados de los siguientes dibujos en los cuales:

La Figura 1 es un gráfico de temperatura y materia seca (%) contra tiempo mostrando el comportamiento del secado de diferentes cantidades de biomasa extrudida a diferentes temperaturas;

La Figura 2 es un gráfico del rendimiento del aceite contra temperatura mostrando biomاسas extrudidas a diferentes temperaturas;

La Figura 3 es un diagrama de flujo de un proceso de extracción por percolación (conocido); y

La Figura 4 es un gráfico del rendimiento del aceite contra tiempo mostrando la relación entre la cantidad de aceite extraído y sus tiempos de extracción.

Ejemplos 1 a 6

### 40 *Procesamiento del caldo de fermentación de Mortierella*

160 l de un caldo de fermentación de *Mortierella alpina*, previamente pasteurizada (68°C por 1 hora) (crecimiento paletizado) fue filtrado en un filtro prensa de marco y plato Dieffenbach estándar (tipo tejido: nycot 2794). El caldo fue filtrado con una presión máxima aplicada de 1.0 bar. Dentro de 20 minutos 160 l de caldo fueron filtrados sobre un área de filtro total de 4.35 m<sup>2</sup>, lo que resultó en un flujo promedio de alrededor de 110 l/m<sup>2</sup>h. La torta de filtro fue lavada con alrededor de 3 volúmenes de torta (= 150 l) del agua del proceso.

Alrededor de 30 kg de la torta húmeda fueron recuperados con un contenido de materia seca de alrededor de 25%. Tres tipos de procedimientos de secado fueron empleados.

### 50 *Secado al vacío*

10 kg de la torta de filtro fueron secados bajo vacío a 35°C en un secador de bandeja (alrededor de 1 m<sup>2</sup> de superficie de secado) al vacío (alrededor de 50 mbar) durante 24 horas resultando en alrededor de 2.5 kg de biomasa seca con un contenido de materia seca de alrededor de 94%. La biomasa seca consistió de biomasa desmenuzada y algunos grumos grandes. El secado al vacío fue consumidor de tiempo probablemente debido a los grumos grandes.

### *Secador de bandeja con ventilación*

10 kg de la torta de filtro fueron secados bajo nitrógeno durante 24 horas a 35°C en un secador de bandeja con ventilación (alrededor de 1 m<sup>2</sup> de superficie de secado). En total alrededor de 2.5 kg de biomasa seca fueron recuperados con un contenido de materia seca de alrededor de 93%. La biomasa seca consistió de biomasa desmenuzada y algunos grumos grandes. El secado en bandeja con ventilación fue consumidor de tiempo probablemente debido a los grumos grandes.

### 65 *Secador de lecho fluido*

5 kg de la torta de filtro fueron secados en un secador de lecho fluido a escala de laboratorio de AEROMATIC (tipo MP-1) a una temperatura de aire de entrada de alrededor de 200°C. La temperatura de abatimiento fue alrededor de

## ES 2 267 137 T3

40°C. En alrededor de 45 minutos la biomasa húmeda fue secada resultando en alrededor de 1 kg de biomasa secada con un contenido de materia seca de alrededor de 81%.

El material seco recuperado por este último método fue usado para la extracción de aceite por medio de hexano a seis temperaturas diferentes (aquí Ejemplos 1 a 6). 150 g de biomasa secada fueron sometidos a la extracción con 1500 ml de hexano (calentado para el reflujo) bajo nitrógeno cubriéndola durante 90 minutos. La masa de células fue filtrada y el solvente en la micela fue evaporado en un rotavapor bajo vacío. Esto resultó en un aceite PUFA crudo. Los resultados son mostrados en la Tabla 1. La extracción a temperatura ambiente dio bajos rendimientos; mejores rendimientos fueron obtenidos a elevadas temperaturas.

TABLA 1

*Extracción de aceite a partir de biomasa*

Numero experimento	Proporción biomasa/hexano	Temperatura en °C	Tiempo de extracción en minutos	g de aceite por 100 g de biomasa secada
1	300	80	30	19.2
2	100	23	30	16.4
3	150	45	60	22.6
4	200	23	120	17.1
5	200	23	30	11.8
6	100	23	120	13.5

El aceite rico en triglicéridos fue obtenido como un aceite amarillo claro, y contenía algún material sólido.

Ejemplo 7 y Ejemplo Comparativo 8

### *Procesamiento de caldo de fermentación de Mortierella*

500 l de caldo (previamente pasteurizados como se describió en el Ejemplo previo) fueron filtrados en un filtro prensa de membrana (SCHULE) a una diferencia de presión de alrededor de 0.5 bar. La torta de filtro fue lavada con 10 volúmenes de torta del agua del proceso y después comprimida durante 30 minutos a 5.5 bar. La torta resultante tuvo un contenido de materia seca de alrededor de 46%. La torta recuperada de esta forma fue extrudida en una extrusora piloto (ODEKERKE, diámetro del cilindro 50 mm, cilindro perfilado). La hilera de estirado tenía 10 orificios con un diámetro de 1.6 mm cada uno. En total 19 kg de la torta de filtro fueron extrudidas en alrededor de 45 minutos.

El extrudido recuperado de esta forma fue secado en un secador de lecho fluido de planta piloto (T4 AEROMATIC 0.26 m<sup>2</sup> de superficie de secado). Dentro de alrededor de 45 minutos el extrudido fue secado a 65°C, resultando en un contenido de materia seca de alrededor de 85% (Ejemplo 7).

Durante el mismo experimento algo de la torta de filtro no fue extrudida (Ejemplo comparativo 8) y secada en un secador de bandeja al vacío a 40°C. El secado fue muy consumidor de tiempo debido a los grandes grumos.

Ambos materiales fueron sometidos a la extracción usando hexano. Las siguientes características de los materiales fueron encontradas:

Extrudido seco: (Ejemplo 7)	principalmente el proceso de extracción de los aglomerados razonablemente fácil
Biomasa seca al vacío: (Ejemplo Comparativo 8)	aglomerados y grumos, muchos granos finos proceso de extracción difícil; malas propiedades de filtración.

## ES 2 267 137 T3

Ejemplos 9 y 10

*Experimentos de extrusión usando el mismo caldo del Ejemplo 7 fueron preparados usando las siguientes extrusoras*

5      *LALESSE (Arnhem, Holanda)*

En el Ejemplo 9 una extrusora universal de tornillo simple LALESSE fue usada. Este tipo de extrusora es normalmente usada en la producción de refrigerios. Maíz molido (contenido de materia seca de alrededor de 95%) fue primero alimentado como una prueba a la extrusora y bajo presión y calor el maíz fue extrudido; una vez fuera de la hilera de estirado el extrudido fue expandido.

El cilindro de este tipo de extrusora fue un cilindro perfilado para transportar el maíz procesado. El tipo de tornillo usado en la extrusión es dependiente del tipo de material procesado. El tornillo fue un tornillo de transporte universal o un tornillo de compresión con un diámetro de 48 mm. La máquina LALESSE es una máquina piloto de 7.5 Kw (accionada a capacidad). El requisito de fuerza total de la máquina es 12.1 Kw. El cilindro de la extrusora pudiera ser calentado o enfriado. Hileras de estirado con 1 y hasta 4 orificios con diámetros de 1.8, 2.0 y 2.2 mm fueron usadas durante la extrusión de la biomasa.

La capacidad de extender la biomasa de *Mortierella* (cilindro enfriado) fue de alrededor de 40 kg/h. En la extrusión la proporción longitud/diámetro del orificio en la hilera de estirado fue variada.

*ALMEX (Zutpteh, Holanda)*

En el Ejemplo 10, usando biomasa de *Mortierella* del Ejemplo 7, una extrusora extensora de la compañía ALMEX fue usada. Este tipo de extrusora es usada en la producción de alimentos para mascotas. Tenía un cilindro liso con pasadores que permiten el transporte de la biomasa. Esos pasadores tienen la misma función que los perfiles en el cilindro de la extrusora LALESSE. El tornillo de la extrusora extensora fue un tornillo modular.

Datos técnicos:      ALMEX Contivar 150  
L/D de 10 (proporción de longitud del tornillo y el diámetro del tornillo)  
Velocidad máxima del tornillo de 180 rpm  
22 Kw (accionada a capacidad)  
Diámetro del tornillo de 150 mm  
Enfriamiento con agua de grifo  
Hileras de estirado: 3 vueltas de orificios con cada orificio de diámetro de 1.8 mm

La temperatura de la biomasa fue elevada hasta alrededor de 25°C durante el procesamiento. La capacidad de la máquina fue de alrededor de 250 kg del extrudido de *Mortierella* por hora.

45    Ejemplo Comparativo 11

*Comparación de la separación sólido/líquido realizada con diferentes métodos*

*Decantador*

350 l de caldo obtenido a partir de una fermentación de *Mortierella alpina* fue decantado en el decantador "FLOTTWEG" (tipo Z 23-3/441). La velocidad fue establecida a alrededor de 4000 rpm. El rango de velocidad diferencial fue variado durante la operación desde 5.5 - 20 rpm.

La alimentación fue establecida en 400 l/h. La biomasa no fue lavada. En total 350 l de caldo fueron decantados. La temperatura de la alimentación fue 8°C y la del sobre nadante 15°C. El contenido de materia seca de la biomasa recuperada fue de alrededor de 25%.

*Decantador + filtro de tambor al vacío*

20 kg de biomasa del experimento del decantador anterior con un contenido de materia seca de 25% fue suspendido en 500 l de agua del proceso en la cual 10 kg de NaCl fueron disueltos. La pasta aguada resultante fue filtrada en un filtro de tambor al vacío con correa de descarga (PAXMAN, tipo tejido: 865.912 K/5 poliprop) sin lavado adicional. La velocidad del tambor fue establecida en 1 rpm y la diferencia de presión en un máximo de 600 mbar. En total 400 l fueron filtrados dentro de 15 minutos. La superficie de la red de filtrado fue de alrededor de 0.3 m<sup>2</sup>, lo que resultó en un flujo promedio de 5000 l/m<sup>2</sup>h (superficie de filtrado). La proporción de filtración fue muy buena pero la 'constitución de la torta' fue bastante mala. El contenido de materia seca de la biomasa filtrada recuperada fue de alrededor de 35%.

## ES 2 267 137 T3

### *Filtro prensa de marco y plato*

5 500 l de caldo fueron filtrados en un filtro prensa de marco y plato (R&B estándar, tipo tejido: Nycot 2794). El caldo fue filtrado con una diferencia de presión de 0.3 bar. Dentro de 35 minutos 500 l de caldo fueron filtrados sobre un área total de filtro de 5 m<sup>2</sup>, lo que resultó en un flujo promedio de  $\pm 175$  l/m<sup>2</sup>h. La torta de filtro fue lavada en 30 minutos con alrededor de 2.5 volúmenes de torta del agua del proceso lo que resultó en un flujo promedio de 400 l/m<sup>2</sup>h.

10 La torta fue secada por soplado con aire por 30 minutos, lo que resultó en un contenido de materia seca de la biomasa recuperada de alrededor de 25%.

### *Filtro prensa de membrana*

15 700 l de caldo fueron filtrados en un filtro prensa de membrana (SCHULE, tipo tejido: propex 46K2). El caldo fue filtrado con una diferencia de presión de 0.3 bar. Dentro de 30 minutos 700 l de caldo fueron filtrados sobre un área de filtro total de 6.8 m<sup>2</sup> lo cual resultó en un flujo promedio de alrededor de 205 l/m<sup>2</sup>h.

20 La torta de filtro fue lavada en 7 minutos con 3 volúmenes de torta (=300 l) de agua del proceso, lo que resultó en un flujo promedio de 375 l/m<sup>2</sup>h.

25 La ventaja de un filtro prensa de membrana sobre un filtro prensa de marco y placa es que la torta después de la filtración puede ser comprimida a alta presión, de manera que el contenido de materia seca de la torta aumentará. La torta fue comprimida a 5.5 bar durante 30 minutos lo que resultó en un contenido de materia seca de la biomasa recuperada de alrededor de 45%.

30 En otro experimento 1100 l de caldo fueron filtrados en un filtro prensa de membrana (SCHULE, tipo tejido: propex 46K2). El caldo fue filtrado con una diferencia de presión de 0.3 bar. Dentro de 45 minutos 1100 l de caldo fueron filtrados sobre un área de filtro total de 12.3 m<sup>2</sup> lo que resultó en un flujo promedio de alrededor de 120 l/m<sup>2</sup>h. La torta de filtro fue lavada en 18 minutos con 3 volúmenes de torta (= 600 l) de una solución de NaCl al 1%, lo que resultó en un flujo promedio de 162 l/m<sup>2</sup>h.

La torta fue comprimida a 6 bar durante 30 minutos, lo que resultó en un contenido de materia seca de la torta de filtro recuperada de alrededor de 55%.

35 Tanto el comprimido como el lavado de la torta con solución salada al 1% tuvo un efecto significativo en el contenido de materia seca de la torta de filtro.

### Ejemplo 12

#### 40 *Extrusión de biomasa con diferentes contenidos de materia seca*

La extrusión fue realizada con una biomasa con diferentes contenidos de materia seca, las cuales fueron obtenidas por el método presentado en el Ejemplo 7 (ver Tabla 2). La extrusión fue realizada usando una extrusora de tornillo simple con un cilindro perfilado y un tornillo universal. La hilera de estirado aplicada en la extrusión tenía un número diferente de orificios y los diámetros de los orificios estaban en el rango de 2 mm.

El diámetro de las partículas obtenidas después de la extrusión fue de alrededor de 2 mm.

50 El rendimiento y la calidad del extrudido dependen del porcentaje de materia seca de la biomasa usada para la extrusión. Aunque un 25% de materia seca dio los peores resultados, para otros microorganismos tal bajo contenido de materia seca puede ser aceptable.

TABLA 2

#### 55 *Resultados de los experimentos de extrusión con biomasa con diferentes contenidos de materia seca*

% Materia seca	Rendimiento de la extrusión	Calidad del extrudido
25	malo	material muy pegajoso
35	bueno	material pegajoso
45	muy bueno	extrudido no pegajoso
65 55	muy bueno	extrudido suelto

## ES 2 267 137 T3

Ejemplos 13 y 14 y Ejemplo Comparativo 15

### *Secado de biomasa extrudida y convencional de Mortierella alpina*

#### 5 *Secado al vacío*

La biomasa convencionalmente recuperada (Ejemplo Comparativo 15, no extrudida) fue secada en un secador de bandeja al vacío pero tomó alrededor de 50 horas a 40°C. El secado fue muy lento debido a los grumos. El contenido de materia seca de la biomasa secada de esta forma fue de alrededor de 92.5%.

10 Para comparación alrededor de 20 g de extrudido (del Ejemplo 11,  $\varnothing_{particula}$  de 2 mm) con un contenido de materia seca de 55% fue secado a escala de laboratorio en un rotavapor. La temperatura del baño de agua fue de 68°C y la presión aplicada 40 mbar. El rendimiento del secado fue razonable, excepto que la biomasa seca se pegó a la pared y sudó un poco de aceite. El contenido de materia seca después del secado fue de 92.3%.

#### 15 *Secado en lecho fluidizado*

En el Ejemplo 13 el secado fue realizado con biomasa a diferentes temperaturas. Donde no ocurrió tratamiento de la biomasa, grandes grumos de biomasa no se secaron completamente. En este caso la biomasa seca fue muy poco homogénea considerando el tamaño de partículas.

Si la biomasa fue pre-tratada antes del secado por medio de la extrusión, el rendimiento del secado mejoró sustancialmente. En este caso el tamaño de partículas de la biomasa seca fue más uniforme.

25 La conclusión de estos resultados es que el secado en lecho fluidizado puede ser realizado con diferentes formas de biomasa aislada, pero que el secado será mejorado usando un extrudido.

En otro experimento (Ejemplo 14), el secado de diferentes cantidades (15 y 30 kg) de extrudido fue realizado en un secador de lecho fluidizado con aire (8000 Nm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>h). Durante el secado fueron tomadas muestras y calculado el contenido de materia seca. En la Fig. 1 la relación entre la temperatura y el contenido de materia seca de (dos) 30 cantidades diferentes es mostrado.

La temperatura del lecho fue establecida en 80°C. El diámetro de la biomasa extrudida fue 1.3 mm. El contenido de materia seca de la biomasa extrudida después del secado fue de alrededor de 96%.

#### 35 Ejemplo 16

### *Extracción de lípido a partir del extrudido secado de Mortierella alpina*

#### 40 *Extracción con agitación del extrudido secado a diferentes temperaturas*

Muestras de 100 g del extrudido secado con respectivamente 93.4 y 97.8% de materia seca fueron extraídos durante 3 horas con 500 ml de hexano o 500 ml de propanol-2, a temperaturas de 20°, 35° y 50°C para el hexano y 20°, 40° y 70°C para el propanol-2. La pasta aguada fue agitada por medio de un agitador de dos paletas en un frasco de 45 fondo redondo de cuatro cuellos y calentada por medio de una manta de calentamiento. Eventualmente el propanol-2 o hexano evaporado fue reciclado por medio de un enfriador de reflujo.

Durante la extracción, cada 30 minutos una muestra de 15 ml del sobre nadante fue tomada del frasco después que la agitación fue detenida y las partículas se asentaron. 1 ml de las muestras fue pipeteado en tubos de eppendorf 2 ml pre-pesados. Después del secado toda la noche bajo vacío a 40°C los tubos de eppendorf fueron pesados y el aceite total fue calculado. Los resultados de los experimentos son mostrados en la Fig. 2.

#### 55 *Conclusión para la extracción con hexano*

- la temperatura no tuvo efecto sobre la cantidad total de lípido que puede ser extraído, es decir, una temperatura de extracción relativamente baja da un buen rendimiento de lípido,
- la temperatura tuvo solamente un pequeño efecto sobre el tiempo en el cual la cantidad total de lípido puede ser extraída,
- la cantidad total de lípido fue extraída dentro de 30 minutos a partir de la biomasa, con 5 volúmenes de hexano a una temperatura por encima de 20°C.

#### 65 *Conclusión para la extracción con propanol-2*

- la temperatura tuvo efecto significativo sobre la cantidad total de lípido que puede ser extraído,

## ES 2 267 137 T3

- la temperatura tuvo efecto significativo sobre el tiempo en el cual la cantidad total de lípido puede ser extraído,
- la cantidad total de lípido fue extraída dentro de 2 horas a partir de la biomasa con 5 volúmenes de propanol-2 a 73°C.

La composición del aceite depende del solvente usado en la extracción (ver Tabla 3). Mientras más polar es el solvente de extracción más fosfolípidos fueron extraídos. La polaridad del solvente puede ser seleccionada para optimizar la composición del aceite.

TABLA 3

*Extracción de la biomasa de Mortierella secada a temperatura ambiente usando dos solventes diferentes*

Sustancia	Aceite hexano	Aceite propanol-2
Tri-glicéridos	93%	85%
di-glicéridos	2%	2%
mono-glicéridos	2%	2%
esteroles	3%	3%
fosfolípidos	2%	6.5%

Fueron observados problemas a gran escala con la filtración de la micela, debido a la desintegración del extrudido en pequeñas partículas debido a la alta velocidad de agitación durante el proceso de extracción.

Estos problemas fueron evitados usando la extracción por percolación en vez de la extracción con agitación.

*Extracción por percolación del extrudido secado con hexano*

Muchas extracciones por percolación fueron realizadas a escala piloto (ver Fig. 3 para un diagrama del proceso). Alrededor de 40-45 kg de biomasa extrudida secada fue extraída con hexano (proporción inicial hexano/biomasa de 4.4 l/kg) a 20°C. El flujo de la bomba de engranaje fue establecido en 1.5 m<sup>3</sup>/h. Hubo una pequeña purga con nitrógeno en el recipiente de retención de alrededor de 0.1 bar.

La extracción fue realizada durante 4 horas (la temperatura aumenta durante la extracción desde 18 a 25°C). Cada 30 minutos fueron tomadas muestras de la micela. De cada muestra, 100 ml fueron evaporados a escala de laboratorio en un rotavapor (T<sub>baño de agua</sub> fue 64°C) durante 20 minutos bajo vacío (alrededor de 50 mbar). La cantidad de aceite fue estimado. Los resultados son presentados en la Fig. 4. Puede ser notado que después de 2 horas un “equilibrio” fue alcanzado. Después de eso, la biomasa extraída fue lavada con alrededor de 0.6 volúmenes del lecho de hexano. Durante la extracción la altura del lecho no cambió.

Las micelas fueron filtradas antes de la evaporación. Durante la extracción se notó que la micela se hizo cada vez más clara, debido a la filtración profunda sobre el lecho de partículas.

Ejemplo 17

*Recuperación del aceite DHA a partir de Cryptocodinium*

Biomasa de 7 l de un caldo de fermentación (previamente pasteurizada, 65°C, por 1 hora) del alga *Cryptocodinium cohnii* fue cosechada usando una centrifuga de laboratorio del tipo BECKMANN JM/6E. El caldo fue centrifugado en porciones de 800 ml durante 2 minutos a 5000 rpm resultando en un sobre nadante claro.

En total 224 g de biomasa con un contenido de materia seca de 13% fue recuperada. Esto significa una concentración de biomasa a cosechar del caldo de fermentación de alrededor de 4 g/kg. Para esta biomasa recuperada 300 g de almidón (ROQUETTE, discontinuo nr. 10EV0024) fueron adicionados para aumentar el contenido de materia seca. La torta recuperada de esta forma fue extrudida por medio de una extrusora de laboratorio de tornillo simple usando un tornillo universal y un cilindro perfilado. El diámetro del orificio en la hilera de estirado fue 2 mm y el espesor de la hilera de estirado fue de 6 mm resultando en un L/D de la hilera de estirado de 3. El extrudido resultante liso fue secado bajo vacío durante toda la noche a 50°C, resultando en un extrudido secado crujiente. El contenido de materia seca de la biomasa secada de esta forma fue de alrededor de 94%.

## ES 2 267 137 T3

Una muestra de alrededor de 180 g del extrudido seco fue extraída con hexano (proporción inicial volumen/biomasa de 5 l/kg). Después de 3 horas de extracción a 60°C la micela fue filtrada sobre un filtro Whatman. La biomasa extraída resultante fue lavada una vez con 1000 ml de hexano fresco. La micela filtrada recuperada de esta forma fue evaporada a 68°C ( $T_{\text{baño de agua}}$ ). De esta forma un aceite que contiene DHA crudo fue recuperado. La concentración del DHA en el aceite fue 32.6% analizado por medio de GC. El aceite recuperado de esta forma contenía alrededor de 67% de tri-glicéridos, 12% de di-glicéridos, 3.7% de esteroides y alrededor de 0.2% de antiespuma (NMR). Otra característica del aceite fue el nivel de carotenoides (0.15 mg/ml de  $\beta$ -caroteno y 5 mg/ml de  $\gamma$ -caroteno).

### Ejemplo 18

Co-extrusión de *C. cohnii* y *M. alpina*

10 l de un caldo de fermentación del hongo *Mortierella alpina* y 10 l de un caldo de fermentación de *Cryptocodium cohnii* fueron mezclados juntos. Para mejorar la capacidad de filtración del caldo mezclado fue adicionado  $\text{CaCl}_2$  (concentración final de 5 g/l). El caldo mezclado fue filtrado y la torta resultante fue mecánicamente deshidratada usando una prensa de frutas típica (prensa de cítricos, HAFICO).

La torta recuperada de esta forma fue extrudida por medio de una extrusora de laboratorio de tornillo simple usando un tornillo de transporte universal en un cilindro perfilado y una hilera de estirado con un orificio de 2 mm. El diámetro del extrudido fue alrededor de 2 mm. El extrudido recuperado de esta forma fue secado en un secador de lecho fluido a escala de laboratorio ( $T_{\text{aire}} = 40^\circ\text{C}$ , tiempo de secado de alrededor de una hora, flujo de aire de 150  $\text{Nm}^3/\text{h}$ , AEROMATIC MP-1). El contenido de materia seca de la biomasa secada de esta forma fue de alrededor de 92%.

Una muestra de alrededor de 100 g de extrudido seco fue usada para la extracción con hexano (proporción inicial volumen/biomasa de 4 l/kg). Después de 2 horas de extracción a temperatura ambiente la micela fue recuperada por medio de filtración al vacío. El extrudido extraído remanente fue lavado con 4 volúmenes de hexano fresco (proporción inicial volumen/biomasa de 4 l/kg). El hexano lavado fue mezclado con la micela y la micela resultante fue evaporada a 50°C ( $T_{\text{baño de agua}}$ ). De esta forma un aceite PUFA crudo fue recuperado conteniendo ARA (C20:4  $\omega$ 6) y DHA (C22:6  $\omega$ 3).

El aceite crudo puede ser refinado de acuerdo a métodos usuales para aceites vegetales/comestibles.

### Ejemplo Comparativo 19

Las varias condiciones de cultivo que fueron usadas para obtener la biomasa y caldos descritos en los ejemplos previos serán ahora dados en la siguiente tabla.

(Tabla pasa a página siguiente)

Microorganismo	Producto	Tipo de proceso	Nutrientes (g/l)	Temperatura (°C)	pH	Tiempo (horas)
<i>Pichia ciferrii</i> ( <i>Hansenula ciferrii</i> )	Tetra-acetil-fito-esfingosina (-TAPS) (extra-celular)	Alimentación discontinua (alimentación de glucosa)	Glucosa: 30 Extracto levadura: 3 Extracto malta: 3 Peptona: 5	25	6.5 - 6.8	96
<i>Mortierella alpina</i>	Ácido araquidónico (intracelular)	discontinuo	Glucosa: 50 Extracto levadu. 5 NaNO <sub>3</sub> : 5 K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> : 3 MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O: 0.5 Sal de amonio minerales	25	5.5 - 7	120-168
<i>Blakeslea trispora</i>	β-caroteno (intracelular)	discontinuo	Farmacia: 75 Glucosa: 10 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : 0.5 MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O: 0.1 Aceite soya: 30 Aceite semilla algodón: 30 dextrina: 60 Triton X-100 1.2 Ácido ascórbico: 6 Ácido láctico: 2 Tiamina-HCl 2mg Isoniazid: 0.075	26 - 28	6.5	7 días
<i>Aspergillus terreus</i>	Lovastatina	Alimentación discontinua (glucosa amoniaco)	Glucosa: 50 Extrac. levad.: 11.3 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : 3.5 Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> : 1.0 MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O: 1.4 CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O: 0.1 PPG (2000) (Antiespumante): 0.1 elementos traza	28	6.5	8 días

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60

Microorganismo	producto	Tipo de proceso	Nutrientes	Temperatura (°C)	pH	Tiempo (horas)
Propionibacterium sp.	Vitamina B <sub>12</sub>	Alimentación discontinua (anaerobica). Aliment. Glucos + después 4 días: 10 mg/l 5,6 dimetilbenzimidazol	Glucosa: 10 Liq. Remojo maiz: 80 (NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> : 16 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : 0.4 Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O: 1.5 MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O: 0.5 Minerales Pantotetanato de Ca: 10 mg	30	5 - 7.5	168
Cryptocodinium cohnii	Ácido docosahexa-noico (-DHA) (intracelular)	Alimentación discontinua (68 g/l glucosa + 24 g/l extracto levadura)	Ocean® agua de mar artificial: 250 (Instante) extract levad: 6 glucosa: 12	20 - 28	7 - 7.8	70 - 80

## Referencias concierntes a las tecnicas de fermentación

65

Maister H.G., Rogovin S.P., Stodola F.H., Wickerham L/J., "Formación de Esfingolípidos extracelulares por Microorganismos. IV., Producción en Planta Piloto de Tetraacetilfitoesfingosina por *Hansenula ciferrii*". *Appl. Microbiol.*, 10, 401-406. (1962).

## ES 2 267 137 T3

**Zu-Yi Li., Yingyin Lu, Yadwad V.B., Ward O.P.**, “Proceso de Producción de Concentrado de Ácido Araquidónico por Cepas de *Mortierella alpina*”.

**Can. J. Biochem. Eng** 73, 135-139 (1995) **Finkelstein M., Huang C-C., Byng G.S., Tsau B-R., Leach J.**, “Cultivo de *Blakeslea trispora* apareada capaz de incrementar la producción de beta-caroteno” patente US 5,422,247 (1995).

**Kojima I., Kouji K., Sato H., Oguchi Y.**, “Proceso para la producción de Vitamina B<sub>12</sub> por técnica de fermentación, y microorganismo que produce Vitamina B<sub>12</sub>”. Patente US 4,544,633 (1985).

**Kyle D.J., Reeb S.E., Sicotte V.J.**, “Producción de ácido decosahexanoico por dinoflagelatos”. Patente US 5,407,937 (1995).

Ejemplo 20

15 *Análisis del aceite crudo y refinado*

Lotes de aceite crudo habían sido preparados por los métodos descritos en el Ejemplo 1 (secado en lecho fluidizado y extracción con hexano).

20 Todos los análisis que son aplicados a los aceites son realizados de acuerdo a los procedimientos descritos por la American Oil Chemist Society (AOCS). Los contenidos de tri-, di-, y monoglicéridos y de fosfolípidos son determinados por H-NMR usando un instrumento 600 MHz.

El aceite crudo tuvo la siguiente composición:

25

lotes	a	b	c
triglicéridos (%)	96.6	96.5	96.6
valor ácido mg/g	1.7	0.3	0.2
30 valor de peróxido meq/kg	2.7	1.3	1.3
valor de anisidina	<1.0	0.3	0.1

El aceite crudo fue refinado por los métodos estándares como es conocido en el procesamiento de aceite comestible.

35

Resumiendo, el aceite fue lentamente calentado a 80-90°C, bajo exclusión de trampas de aire. Al aceite una solución diluida de NaOH fue adicionada (125% de cantidad estequiométrica equivalente a la cantidad de ácidos grasos libres). Después de un tiempo de reacción de 30 minutos la fase agua fue separada por centrifugación. El aceite fue lavado con agua hasta una reacción neutral de fenoltaleína. (Para este propósito 3 lavados con 10% de volumen de aceite fueron suficientes). Las capas de agua fueron eliminadas por centrifugación. Después del último paso de lavado el aceite fue secado al vacío a 70°C. El aceite secado fue clarificado por la adición de la arcilla clarificante Tonsil Supreme FF. (2% en base al peso fue adicionada). La arcilla clarificante fue contactada durante una hora a 60°C a una presión de 10-15 mbar. Después del tiempo de reacción, la arcilla clarificante fue eliminada por filtración en un filtro de hojas a una presión de 1 bar (con nitrógeno). El aceite filtrado fue desodorizado de manera discontinua al vacío a 180°C a 2-5 mbar, durante 2 horas. El vapor fue usado como medio de separación. Vapor fue formado *in situ* de esta forma a partir del agua adicionada al aceite. Después del tiempo de reacción el aceite fue enfriado. La presión en el reactor fue llevada a 1 bar por la adición de gas nitrógeno.

40

45

El resultado de este proceso fue un aceite claro con la siguiente composición:

50

lote	a	b	c
fosfolípidos (%)	<0.05	<0.05	<0.05
triglicérido (%)	96.6	96.5	96.6
55 diglicéridos (%)	1.6	1.3	1.0
valor ácido mg/g	0.2	0.15	0.1
valor de peróxido meq/kg	1.6	0.8	0.4
valor de anisidina	4.1	1.9	3.1

60

tiempo de inducción Rancimat:

130°C (horas)	2.5		
100°C (horas)	>4	>4	>4
65 80°C (horas)	>10	>10	>10

## ES 2 267 137 T3

### REIVINDICACIONES

1. Un aceite microbiano, que comprende al menos un ácido graso poli-insaturado (PUFA), el cual tiene un contenido de triglicérido de 93% a 97%.  
5
2. Un aceite de acuerdo a la reivindicación 1 donde el ácido graso poli-insaturado es un ácido graso poli-insaturado C18, C20 o C22  $\omega$ -3 o un C18, C20 o C22  $\omega$ -6.
3. Un aceite de acuerdo a la reivindicación 1 o 2 donde el PUFA es un ácido graso poli-insaturado C20 o C22  $\omega$ -3 o un C20  $\omega$ -6.  
10
4. Un aceite de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde el PUFA es ácido araquidónico (ARA), ácido eicosapentanoico (EPA) y/o ácido docosahexanoico (DHA).
5. Un aceite de acuerdo a la reivindicación 4 donde el PUFA es ácido araquidónico (ARA).  
15
6. Un aceite de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde el PUFA es producido por un hongo.
7. Un aceite de acuerdo a las reivindicaciones 1 a 5 donde el PUFA es producido por un alga.  
20
8. Un aceite de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 producido por un hongo del género de *Mortierella*.
9. Un aceite de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o 7 producido por un alga del género de *Cryptocodinium*.  
25
10. Un aceite de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones precedentes el cual tiene un contenido de triglicérido  $\geq 95\%$ .
11. Un aceite de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones precedentes el cual tiene un tiempo de inducción Rancimat  $\geq$  de 5 horas a 80°C.  
30
12. Un proceso para obtener un aceite que comprende al menos un ácido graso poli-insaturado (PUFA) a partir de una biomasa microbiana, el proceso comprendiendo:  
35
  - a) proporcionar una biomasa con un contenido de materia seca de desde 25 a 80%;
  - b) granular la biomasa en partículas granulares;
  - 40 c) secar las partículas granulares para dar gránulos secados; y
  - d) extraer o aislar del aceite de los gránulos secados.
13. Un proceso de acuerdo a la reivindicación 12 donde las partículas granulares tienen un contenido de materia seca promedio de desde 30 a 70% y/o los gránulos secados tienen un contenido de materia seca promedio de al menos 80%.  
45
14. Un proceso de acuerdo a la reivindicación 12 o 13 donde el aceite es extraído usando un solvente apropiado y/o adicionalmente comprende refinar el aceite extraído.  
50
15. Un proceso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14 donde en (b) la granulación es efectuada por extrusión de la biomasa y/o la biomasa es sometida a desmenuzamiento o amasado antes de la granulación.
16. Un proceso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15 donde la biomasa en (a) es obtenida por separación sólido/líquido realizada en el caldo de fermentación, opcionalmente combinada con deshidratación mecánica.  
55
17. Un proceso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16 donde:  
60
  - (i) la biomasa con un contenido de materia seca de 25 a 80% es obtenida por la adición de un material sólido a la biomasa; y/o
  - (ii) el secado de la biomasa de granulación en (c) hasta un contenido de materia seca de al menos 80% es realizado por secado en lecho fluidizado o lecho sub-fluidizado.
18. Un proceso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 12 a 17 donde la biomasa comprende, o se origina de, un hongo o un alga.  
65

## ES 2 267 137 T3

19. Un proceso de acuerdo a la reivindicación 18 donde el hongo pertenece al orden *Mucorales* o el alga es un dinoflageto y/o pertenece al género *Crythecodinium*.

20. Un proceso de acuerdo a la reivindicación 19 donde el hongo pertenece al género *Mortierella*.

21. Un proceso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20 donde el hongo es *Mortierella alpina* y/o el alga es *Crythecodinium cohnii*.

22. Un proceso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 12 a 21 donde el ácido graso poli-insaturado (PUFA) está contenido en un lípido.

23. Un proceso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 12 a 22, donde el ácido graso poli-insaturado es como el definido en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5.

24. El uso de un aceite microbiano de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para la preparación de un composición cosmética o alimenticia o un suplemento nutricional.

25. El uso de acuerdo a la reivindicación 24 donde la composición alimenticia comprende un preparado para lactantes.

26. Un alimento o composición cosmética o un suplemento nutricional para humanos y animales que comprende un aceite como el definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

27. Una composición alimenticia de acuerdo a la reivindicación 26 la cual es un preparado para lactantes.