



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 320 645**

51 Int. Cl.:

C12N 1/00 (2006.01)

C12N 1/12 (2006.01)

C12N 1/14 (2006.01)

C12N 1/16 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03738077 .1**

96 Fecha de presentación : **20.06.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1513922**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.03.2005**

54

Título: **Proceso de pasteurización para células microbianas y aceite microbiano.**

30

Prioridad: **19.06.2002 EP 02254262**
18.12.2002 EP 02258713

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.05.2009

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.05.2009

73

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

72

Inventor/es: **Schaap, Albert y**
Verkoeijen, Daniel

74

Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 320 645 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).

ES 2 320 645 T3

DESCRIPCIÓN

Proceso de pasteurización para células microbianas y aceite microbiano.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un proceso para pasteurizar células microbianas, que comprende calentar las células de 40°C a 70°C en no más de 30 minutos. La velocidad de calentamiento durante el proceso de pasteurización puede ser de al menos 0.5°C/minuto. El proceso de pasteurización puede comprender tres etapas, a saber: una etapa de calentamiento, una etapa de meseta (en la cual las células se mantienen a temperatura constante) y una etapa de enfriamiento. Si se representa gráficamente el protocolo de pasteurización, el área bajo la gráfica del tiempo (minutos) frente a la temperatura (°C) es menor de 13 000°C.minuto. Después de la pasteurización, se puede extraer de las células un ácido graso poliinsaturado (AGPI), tal como el ácido araquidónico, o un aceite microbiano. El aceite puede tener un índice de peróxidos (IP) bajo y/o un índice de anisidina (IAN) bajo.

15 **Introducción**

Los ácidos grasos poliinsaturados, o AGPI, se encuentran en la naturaleza y diferentes organismos unicelulares (algas, hongos, etc.) producen una gran variedad de AGPI. Un AGPI particularmente importante es el ácido araquidónico (AA), el cual es uno de tantos ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPI-CL). Químicamente, el ácido araquidónico es el ácido *cis*-5,8,11,14-eicosatetraenoico (20:4) y pertenece a la familia (n-6) de los AGPI-CL.

El ácido araquidónico es un precursor principal de una gran variedad de compuestos biológicos activos conocidos colectivamente como eicosanoides, un grupo que comprende prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos. El ácido araquidónico también es uno de los componentes de la fracción lipídica de la leche materna humana y se considera esencial para un desarrollo neurológico óptimo del lactante. El ácido araquidónico tiene una gran variedad de aplicaciones diferentes, incluido su uso en preparados para lactantes, productos alimenticios y piensos.

El documento WO-A-97/37032 (Gist-Brocades) se refiere a la preparación de un aceite microbiano, que contiene AGPI, a partir de biomasa pasteurizada. Sin embargo, no se informa de un calentamiento rápido hasta, o un enfriamiento partiendo de, una temperatura a la cual tiene lugar la pasteurización. Además, no se tiene en cuenta la cantidad total de energía empleada durante el proceso de pasteurización.

Tanto el documento WO-A-00/1504, como el WO-A-01/67886 se refieren al uso de hongos *Mucorales* en la preparación de productos alimentarios. El primero de estos documentos se refiere a la necesidad de realizar una reducción de ARN antes de incluir las células en los alimentos, y sugiere utilizar una etapa de calentamiento. Se puede realizar una pasteurización o choque térmico por separado. El segundo documento sugiere que se puede evitar el paso de calentamiento para reducir el contenido de ARN, si se permite que las células fúngicas se conserven en el recipiente de fermentación y se dejen "madurar".

La solicitud de patente internacional N° PCT/EP01/08902, publicada como EP-A-1178103, se refiere al proceso para la preparación de mezclas de aceites mediante la combinación de un aceite crudo que contiene AGPI ω 6 con un aceite crudo que contiene AGPI ω 3, para producir una mezcla de aceites, y posterior purificación de la mezcla de aceites crudos.

Se conocen procesos que implican el calentamiento de biomasa o de células microbianas. También se sabe, del documento WO-A-97/37032, que las células microbianas pueden pasteurizarse, antes de la extracción de un AGPI de las mismas, en forma de un aceite. Sin embargo, los presentes solicitantes han descubierto un nuevo proceso de pasteurización que es capaz de mejorar la calidad del aceite que se puede extraer de las células pasteurizadas. En particular, el aceite resultante puede oxidarse menos, o ser menos oxidado, y puede tener un índice de peróxidos bajo (IP) y/o un índice de anisidina bajo (IAN). Además, los solicitantes han descubierto que este nuevo proceso de pasteurización es más eficaz porque requiere menos energía. El proceso es, por lo tanto, beneficioso porque no sólo es capaz de mejorar la calidad del aceite, sino que también puede reducir costes, ya que se requiere menos energía.

55 **Breve descripción de las figuras**

La Figura 1 es una representación gráfica de la temperatura (°C) frente al tiempo (minutos) para tres protocolos de pasteurización (A y C pertenecen a la invención, B se proporciona para comparar);

La Figura 2 es una representación gráfica de la temperatura (°C) frente al tiempo (minutos) para la pasteurización en tres mesetas de temperatura diferentes (40, 70 y 85°C);

Las Figuras 2 y 4 son representaciones gráficas del IAN (y del IP para la Fig.3) frente al tiempo (horas);

La Figura 5 es una representación gráfica del IP (meq/kg) y del IAN frente a la temperatura (°C) para la pasteurización a dos tiempos diferentes (permanencia/meseta) (8 y 300 segundos);

ES 2 320 645 T3

Las Figuras 6 y 7 son representaciones gráficas de la temperatura (°C) frente al tiempo (segundos) para dos tiempos diferentes (permanencia/meseta) (8 segundos para la Figura 6 y 5 minutos para la Figura 7) a cinco temperaturas diferentes (60, 80, 100, 120 y 140°C).

5 Descripción de la invención

Por lo tanto, la presente invención proporciona un proceso de pasteurización mejorado para células microbianas. A pesar de que requiere menos energía, el proceso de pasteurización puede producir un producto de mejor calidad.

10 Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un proceso para pasteurizar células microbianas, el cual comprende calentar las células (a una temperatura comprendida) entre 40°C y 60°C en no más de 30 minutos o el calentamiento de las células a una velocidad de al menos 0.5°C/minuto. Por consiguiente, este aspecto proporciona un calentamiento rápido de las células microbianas durante la pasteurización, y una velocidad tan alta no se ha proporcionado en la materia. Mientras que en la materia se dan temperaturas de pasteurización, no se aprecia
15 ni se discute la velocidad de calentamiento, o que este parámetro pueda ser importante, ni que una velocidad relativamente rápida pueda proporcionar ventajas. De hecho, altas velocidades de calentamiento van en contra toda lógica, ya que se podría esperar que causasen oxidación, o bien degradación del AGPI o del aceite que se puede extraer de las células.

20 Un segundo aspecto de la segunda invención se refiere a un proceso para pasteurizar células microbianas, el cual comprende un protocolo de pasteurización que comprende (al menos) tres etapas. Estas son, a saber: una (primera) etapa de calentamiento, una (segunda) etapa de meseta (durante la cual las células microbianas se mantienen a temperatura deseada, o durante la cual las células se mantienen a una temperatura constante y/o máxima), y una (tercera) etapa de enfriamiento. Este aspecto de la invención se conoce como el protocolo de pasteurización de tres etapas. Si
25 este protocolo se representa en una gráfica del tiempo frente a la temperatura, se puede obtener un trapecio.

Un tercer aspecto de la invención se refiere a un proceso para pasteurizar células microbianas, el cual comprende utilizar un protocolo de pasteurización tal que el área bajo la gráfica del tiempo (minutos) frente a la temperatura (°C) sea menor de 13 000°C.min. El área bajo la gráfica del tiempo frente a la temperatura proporciona la cantidad de energía
30 consumida para calentar las células durante el proceso de pasteurización. Se ha descubierto que un calentamiento rápido y/o enfriamiento rápido (que se corresponden, respectivamente, con la primera y la tercera etapa del segundo aspecto) puede proporcionar ventajas, tales como un aceite de mejor calidad. Además, la cantidad de energía requerida para el proceso de pasteurización se puede reducir en comparación con los procesos de pasteurización descritos en la materia. Este tercer aspecto, por lo tanto, concierne al aporte energético requerido para el proceso de pasteurización.

35 Un cuarto aspecto de la invención se refiere a un proceso para pasteurizar células microbianas, el cual comprende (calentar las células y de esta manera) mantener las células a una temperatura elevada (T, °C) durante un tiempo (t, minutos), por ejemplo, en una etapa de meseta, en la cual el producto t.T (es decir, la multiplicación del parámetro del tiempo por el de la temperatura, por ejemplo, durante la etapa de meseta) es de 140 a 100 800°C.minuto. Como se
40 notará, este cuarto aspecto es similar al segundo aspecto, en que contiene una etapa de meseta. Las células se pueden mantener en esta etapa a una temperatura constante o máxima. El producto t.T puede, por lo tanto, representar el área bajo la gráfica del tiempo frente a la temperatura para esta etapa de meseta.

Primer aspecto - Calentamiento rápido

45 En este aspecto las células se calientan para que la temperatura de las células pase de 40°C a 60°C en no más de 30 minutos (tal como en no más de 15 minutos). Como alternativa o además, las células se calientan a una velocidad de al menos 0.5°C/minuto. Por supuesto, las células microbianas pueden partir de (o calentarse desde) una temperatura menor de 40°C. Por ejemplo, las células pueden estar a temperatura en condiciones normales temperatura ambiente.
50 Las células pueden estar a la temperatura de fermentación, tal como 30°C ± 5°C. Así pues, cuando comienza el calentamiento, las células pueden estar a una temperatura de 20 a 40°C, tal como de 23 a 27°C (o de 25 ó 29 a 32 ó 37°C). En algunos casos, las células microbianas se pueden haber enfriado, por ejemplo, después de que haya terminado la fermentación. Así pues, cuando comienza el calentamiento, las células pueden tener una temperatura (inicial) de 5 a 10°C, tal como de 7 a 9°C.

55 Las células microbianas se pueden calentar de forma que su temperatura aumente por encima de 60°C. Así pues, puede que ésta no sea la temperatura final de las células microbianas durante la pasteurización. De hecho, las células pueden calentarse a una temperatura mayor de 60°C. La temperatura puede aumentar hasta que se alcance una temperatura de 70 a 90°C, 110 ó 130°C, tal como de 75 a 87°C, y de forma óptima de 78 a 84°C. La temperatura máxima durante la pasteurización puede, por lo tanto, entrar dentro de estos rangos, pero para algunas realizaciones puede alcanzar 100, 120 ó 140°C. Preferentemente, las células se conservan o mantienen a esa temperatura (máxima).

60 De lo cual se notará que las células se pueden calentar a una temperatura menor de, o que parte de, 40°C, hasta una temperatura mayor o igual a 60°C. El rango de 40 a 60°C puede producir un “clic” que extienda el calentamiento/rango de temperatura para el cual se puede precisar (y, por lo tanto, calcular) un tiempo (y, por lo tanto, una velocidad).

En el primer aspecto, el calentamiento rápido supone una velocidad de calentamiento mayor de 0.5°C/minuto. Preferentemente, la velocidad es de al menos 0.6, 0.1 o incluso 1.5°C/minuto. Sin embargo, se consideran velocidades

ES 2 320 645 T3

de calentamiento particularmente rápidas, dependiendo del equipo y del volumen o del peso de las células microbianas a calentar. Por lo tanto, la invención incluye velocidades de calentamiento de más de 2.0 o incluso 2.5°C/minuto.

5 Se pueden obtener velocidades de calentamiento particularmente altas utilizando un equipo especializado. Éste puede alcanzar una temperatura alta en un periodo de tiempo corto, y, al hacerlo, esto puede minimizar cualquier oxidación o deterioro del AGPI o aceite microbiano que puede ser aislado posteriormente. Por lo tanto, el calentamiento puede tener lugar hasta una temperatura máxima de hasta 140, 150 ó 160°C. Preferentemente, el calentamiento puede alcanzar un rango de temperatura de 100 a 180°C, tal como de 120 a 160°C, preferentemente de 130 a 150°C. Al emplear calentadores específicamente rápidos, estas temperaturas se pueden alcanzar particularmente rápido, por ejemplo, en un tiempo menor de un minuto (30 segundos). Tales temperaturas se pueden alcanzar en 20, 30, 40 ó 50 segundos, o pueden llevar hasta 150, 175, 200, 225 ó 250 segundos. Sin embargo, tales temperaturas se pueden alcanzar en tan sólo 2, 4, 6, 8 ó 10 segundos, por ejemplo, si se está utilizando un calentador de infusión, o con muestras relativamente pequeñas. Así pues, se pueden alcanzar velocidades de calentamiento de hasta 50, 100, 150 o incluso 200°C por minuto. Por lo tanto, son posibles velocidades de calentamiento algo menores, de 5 ó 10 a 50 ó 60°C por minuto, tales como de 15 a 45°C por minuto.

Se ha descubierto que este rápido calentamiento durante una rápida pasteurización, no sólo es más eficaz, y requiere menos energía, sino que parece que es al menos un factor responsable de la obtención de un aceite microbiano de mejor calidad (una vez extraído de las células tras la pasteurización).

Segundo aspecto - Protocolo de pasteurización en tres etapas

La primera etapa puede ser una etapa de calentamiento. Ésta, de hecho, corresponde al calentamiento rápido descrito en el primer aspecto de la invención, y, por lo tanto, todas las peculiaridades y características del primer aspecto se aplican a la primera etapa (de calentamiento) del segundo aspecto *mutatis mutandis*.

La segunda etapa corresponde a cuando las células están en una meseta (de temperatura). Las células pueden, así pues, conservarse a una temperatura particular deseada (más o menos 1 ó 2, 5 o incluso 10°C) durante el tiempo deseado. Las células pueden, por lo tanto, mantenerse a una temperatura constante. Preferentemente, esta temperatura (o rango de temperaturas), en la etapa de meseta, es la temperatura máxima alcanzada durante el protocolo de pasteurización. La temperatura en la etapa de meseta (y/o la temperatura máxima durante la pasteurización) es, preferentemente, de al menos 70°C. Puede ser menor de 90 ó 100°C, convenientemente de 70 a 85°C, tal como de 70 a 77°C. Como alternativa, puede ser de 80 a 160°C, tal como de 100 a 140°C.

La duración de la etapa de meseta, o el tiempo que las células se conservan a la temperatura deseada o máxima, puede ser de 5 segundos a 90 minutos, tal como de 1 ó 10 a 80 minutos, por ejemplo, de 20 a 70 minutos. De forma óptima, este tiempo es de 40 ó 50 a 60 ó 70 minutos, tal como de 45 a 65 minutos, y convenientemente de 55 a 63 minutos. También son posibles tiempos particularmente cortos, p.ej. de 8 segundos a 5 minutos.

La tercera etapa es una etapa de enfriamiento. Preferentemente, las células se enfrían a una temperatura que es igual a, o entra dentro de, los rangos mencionados para el inicio del calentamiento (o primera etapa). Preferentemente, las células microbianas se enfrían y/o calientan linealmente (en la primera y/o tercera etapa, según proceda), es decir, cuando se representa en una gráfica del tiempo frente a la temperatura, el perfil de enfriamiento o calentamiento toma la forma de (aproximadamente) una línea recta. Las células se pueden dejar enfriar, o se pueden enfriar de forma activa, por ejemplo, utilizando un intercambiador de calor y/o una sustancia refrigerante, por ejemplo (bajando) a temperatura en condiciones normales o a temperatura ambiente, o una temperatura menor.

Preferentemente, la velocidad de enfriamiento es de al menos 0.4, 0.6, 1.0 ó 1.5°C/minuto. Estos valores representan velocidades de enfriamiento alcanzables cuando las células se dejan enfriar. Sin embargo, son posibles velocidades de enfriamiento más rápidas, especialmente si se emplea un enfriamiento activo. Así pues, se pueden alcanzar velocidades de enfriamiento de al menos 2.0, 2.5, 3.0 o incluso 3.5°C/minuto. Sin embargo, son posibles velocidades de enfriamiento mayores, tales como mayores de 5°C por minuto, p.ej., de 7 ó 10 a 50 ó 60°C/por minuto, preferentemente de 15 a 45°C por minuto.

La velocidad de calentamiento y/o enfriamiento preferida se mantiene preferentemente durante al menos 10, 20 ó 30°C, aunque en algunas realizaciones esto puede conseguirse durante al menos un rango de 40 ó 50°C.

Se notará que, con una etapa rápida de calentamiento y con una etapa rápida de enfriamiento, la cantidad de energía empleada para la pasteurización se puede reducir. Esto no sólo puede dar lugar a un ahorro en los costes, sino que puede que no afecte negativamente a la calidad del aceite microbiano (final), de hecho, parece tener efectos beneficiosos sobre el aceite.

Tercer aspecto - Área bajo la gráfica del tiempo frente a la temperatura (aporte energético)

Se notará del segundo aspecto, que si el protocolo de pasteurización de la invención se representa en una gráfica del tiempo frente a la temperatura, se obtiene una forma de trapecio. La primera etapa (de calentamiento) y la segunda etapa (de enfriamiento) pueden ser cada una de forma triangular, mientras que la intermedia o segunda etapa (de

ES 2 320 645 T3

meseta) (el objeto del cuarto aspecto) es (normalmente) rectangular. El área bajo la gráfica del tiempo frente a la temperatura representa la cantidad de energía aportada al sistema. Al dividir el protocolo de pasteurización en tres partes, se puede calcular el área de la gráfica, y, por consiguiente, el aporte energético.

5 En el tercer aspecto, el área bajo la gráfica del tiempo (en minutos) frente a la temperatura (en °C) es menor de 13 000°C/minuto. Sin embargo, se han conseguido cantidades mucho menores que ésta, y son posibles valores menores de 11 000, 10 000, 9000, 8000 o incluso 1000°C/minuto. En aspectos preferidos de esta invención, estos valores no pueden ser mayores de 7000, 6000 ó 800°C/minuto. En la gráfica a la cual se hace referencia, el tiempo se representa en el eje x (o eje horizontal o de abscisas) y 0°C representa el origen. La temperatura, por lo tanto, se representará en el eje y (o eje vertical o de ordenadas) y 0°C representa el origen.

15 Una vez que las células microbianas han sido calentadas hasta su temperatura de pasteurización, entonces pueden enfriarse (o son enfriadas). Las células, normalmente, se enfrían a temperatura en condiciones normales o ambiente, o al menos a una temperatura menor de 30°C. Por lo tanto, existe un tiempo, no sólo para que las células se calienten de 30°C a 60°C, sino que también existe un tiempo para que las células se enfríen de 60°C a 30°C. Se pueden sumar estos dos tiempos para obtener un tiempo conjunto de calentamiento y enfriamiento de 30-60-30°C. Preferentemente, este conjunto es únicamente menor de 150 minutos, tal como menor de 120 ó 100 minutos. Sin embargo, con muestras más pequeñas, se pueden conseguir tiempos mucho más rápidos, y el tiempo conjunto (de 30 a 60 y vuelta a 30°C) puede ser menor de 70, 50 o incluso 30 minutos.

20 *Cuarto aspecto - Protocolo de pasteurización con etapa de meseta*

25 Este protocolo puede ser un protocolo conforme al segundo aspecto, en el cual existen una (p. ej., primera) etapa de calentamiento, y una (p. ej., segunda) etapa de enfriamiento y, entre medias, una etapa (p. ej., segunda, media o intermedia) de meseta. Sin embargo, esto no es esencial, y se pueden considerar otros protocolos de pasteurización. El cuarto aspecto se refiere a las peculiaridades preferidas de esta etapa de meseta. Todas las peculiaridades y características del segundo (y de otros) aspectos se aplican a este cuarto aspecto *mutatis mutandis*.

30 Las células se mantienen o se conservan a una temperatura particular deseada (más o menos 1, 2, 5 o incluso 10°C) para una temperatura T (°C) y para un tiempo t (minutos). Estos dos parámetros se pueden multiplicar entre sí para dar el producto t.T. Éste es convenientemente de 140 ó 280 a 50 000 ó 100 800°C/minuto. Preferentemente, este producto es de 500, 1000, 2000 ó 3000, o incluso de 6000 a 10 000, 18 000 ó 25 000°C/minuto. De forma óptima, el producto t.T es de 2000 a 6000, tal como de 3000 a 5000, y de forma óptima de 4000 a 4500°C/minuto. En algunas realizaciones, el producto t.T es de 13 a 900, tal como de 100 ó 200 a 700 ó 800, y de forma óptima de 300 a 400 a 600 ó 700°C/minuto.

35 Por lo tanto, de una forma similar al tercer aspecto, se notará que el producto t.T representa el área bajo la gráfica del tiempo frente a la temperatura para las células, cuando se mantienen a la temperatura elevada. Así pues, el factor de multiplicación t.T es, efectivamente, el área bajo la gráfica para la etapa de meseta únicamente (sin incluir el calentamiento ni el enfriamiento).

40 *Extracción de un AGPI*

45 Un quinto aspecto de la presente invención se refiere a un proceso para obtener un AGPI a partir de células microbianas, el cual comprende pasteurizar las células conforme a un aspecto cualquiera del primer, segundo, tercero ó cuarto aspectos de la invención, como se describieron anteriormente, y extraer y/o aislar de las células pasteurizadas un AGPI.

50 Un sexto aspecto de la presente invención se refiere a un aceite microbiano, el cual puede comprender al menos el 40% de ácido araquidónico (AA) y/o puede tener un contenido de triglicéridos de al menos el 90%. El aceite puede tener un IP menor de 2.5, 1.5, 0.8, 0.6 o incluso 0.5 y/o un IAn menor de 1.0. El aceite se prepara mediante el proceso del quinto aspecto.

Ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) y aceites microbianos

55 El AGPI puede ser un único AGPI, o dos o más AGPI diferentes. El/cada AGPI puede ser de la familia n-3 o de n-6. Preferentemente, es un AGPI C18, C20 o C22. Puede ser un AGPI con al menos 18 átomos de carbono y/o al menos 3 ó 4 dobles enlaces. El AGPI se puede obtener en forma de un ácido graso libre, una sal, como un éster de un ácido graso (p.ej., éster metílico o etílico), como un fosfolípido, y/o en forma de un mono, di o triglicérido.

60 Los AGPI (n-3 y n-6) adecuados incluyen:

ácido docosahexaenoico (ADH, 22:6 Ω3), convenientemente, a partir de algas u hongos, tales como la (dinoflagelada) *Cryptocodinium* o el (hongo) *Thraustochytrium*;

65 ácido γ-linolénico (AGL, 18:3 Ω6);

ácido α-linolénico (AAL, 18:3 Ω3);

ácido linoleico conjugado (ácido octadecadienoico, ALC);

ES 2 320 645 T3

ácido dihomo- γ -linolénico (ADGL, 20:3 Ω 6);

ácido araquidónico (AA, 20:4 Ω 6); y

5 ácido eicosapentaenoico (AEP, 20:5 Ω 3).

Los AGPI preferidos incluyen el ácido araquidónico (AA), el ácido docosahecanoico (ADH), el ácido eicosapentaenoico (AEP) y/o el ácido γ -linoleico (AGL). Se prefiere en particular el AA.

10 El AGPI se puede obtener mediante las células pasteurizadas en el proceso de la invención, tales como una célula microbiana. Puede tratarse de una célula de bacteria, alga, hongo o levadura. Se prefieren los hongos, preferentemente del orden de *Mucorales*, por ejemplo, *Mortierella*, *Phycomyces*, *Blakeslea*, *Aspergillus*, *Thraustochytrium*, *Pythium* o *Entomophthora*. La fuente de AA preferida es la *Mortierella alpina*, *Blakeslea trispora*, *Aspergillus terreus* o *Pythium insidiosum*. Las algas pueden ser dinoflageladas y/o incluyen *Porphyridium*, *Nitzschia* o *Crypthecodinium* (p. ej., *Crypthecodinium cohnii*). Las levaduras incluyen las del género *Pichia* o *Saccharomyces*, tales como *Pichia ciferii*. Las bacterias pueden ser del género *Propionibacterium*. El aceite microbiano puede ser un líquido (a temperatura ambiente).

20 Se prefiere que la mayor parte del AGPI esté en forma de triglicéridos. Así pues, preferentemente al menos el 50%, tal como al menos el 60%, o de forma óptima al menos el 70%, del AGPI está en forma de triglicéridos. Sin embargo, la cantidad de triglicéridos puede ser mayor, tal como al menos el 85%, preferentemente al menos el 90%, y de forma óptima al menos el 95% o 98%, del aceite. De estos triglicéridos preferentemente al menos el 40%, tal como al menos el 50%, y de forma óptima al menos el 60%, del AGPI está presente en la posición α del glicerol (presente en la estructura básica de los triglicéridos), también se da en las posiciones 1 ó 3. Se prefiere que al menos el 20%, tal como al menos el 30%, de forma óptima al menos el 40%, del AGPI esté en la posición β (2).

25 El aceite microbiano comprende al menos el 35, 40 ó 45%, o más, de un AGPI de interés, tal como el ácido araquidónico. Puede tener un contenido de triglicéridos de al menos el 90%. Preferentemente, el aceite microbiano tiene un contenido de triglicéridos del 90 al 100%, tal como de al menos el 96%, preferentemente de al menos el 98%, más preferentemente de al menos el 99% y de forma óptima más del 99.5%. Típicamente, el aceite microbiano tendrá un contenido de ácido eicosapentaenoico (EPA) menor del 5%, preferentemente menor del 1% y más preferentemente menor del 0.5%. El aceite puede tener menos del 5%, menos del 2%, menos del 1% de cada ácido graso poliinsaturado (AGPI) C20, C20:3, C22:0 y/o C24:0. El contenido de ácidos grasos libres (AGL) puede ser ≤ 0.4 , 0.2 ó 0.1. El aceite puede tener un poco o nada de AGL y/o ADGL.

35 El aceite microbiano puede ser un aceite crudo. Puede haber sido extraído de las células utilizando un disolvente, tal como dióxido de carbono supercrítico, hexano o isopropanol.

Proceso de pasteurización

40 La pasteurización, en general, tendrá lugar una vez haya terminado la fermentación. En una realización preferida, la pasteurización dará fin a la fermentación, ya que durante la pasteurización el calor matará las células. Por lo tanto, se puede realizar la pasteurización sobre el caldo de fermentación (o las células del medio líquido (acuoso)), aunque se puede realizar sobre la biomasa microbiana obtenida del caldo. En el primer caso, la pasteurización se puede llevar a cabo mientras las células microbianas están aún dentro del fermentador. La pasteurización, preferentemente tiene lugar antes de cualquier procesado adicional de las células microbianas, por ejemplo, desmenuzado en forma de gránulos (p. ej., por extrusión) o amasado.

50 Preferentemente, el protocolo de pasteurización es suficiente para inhibir o inactivar una o más enzimas que pueden afectar negativamente o degradar un AGPI o aceite microbiano, por ejemplo una lipasa.

Una vez haya terminado la fermentación, el caldo de fermentación se puede filtrar o tratar para eliminar agua o líquidos acuosos. Tras la eliminación, se puede obtener una "pasta" de biomasa. Si la pasteurización no se ha realizado, las células deshidratadas (o la pasta de biomasa) se puede someter a la pasteurización.

55 Proceso de extracción de AGPI

60 El AGPI (o aceite microbiano, que normalmente comprende el AGPI) puede entonces extraerse de las células microbianas. Preferentemente, se extrae de gránulos (p. ej., secos) (p. ej., extruidos) que contienen las células. La extracción se puede llevar a cabo utilizando un disolvente. Preferentemente, se utiliza un disolvente apolar, por ejemplo, un C₁₋₈, preferentemente un alcano C₂₋₆, por ejemplo, hexano. Se puede utilizar dióxido de carbono (en forma líquida, por ejemplo, en estado supercrítico).

65 Preferentemente, se deja que el disolvente se filtre a través de los gránulos secos. En el documento WO-A-97/37032 se describen técnicas de granulación y de extrusión de microorganismos adecuadas, y la subsecuente extracción de un aceite microbiano que contiene AGPI.

El disolvente permite obtener un aceite crudo que contiene AGPI. Este aceite se puede utilizar en tal estado, sin procesado adicional, o puede someterse a uno o más pasos de refinado. Sin embargo, un aceite crudo es normalmente aquél

ES 2 320 645 T3

que contiene un disolvente, tal como un disolvente que se utiliza para extraer el aceite (p. ej., hexano, o un alcohol tal como alcohol isopropílico), o que no ha sido sometido a uno (preferentemente a ninguno) de los siguientes pasos de refino. Se describen protocolos de refino adecuados en la solicitud de patente internacional N° PCT/EP01/08902. Por ejemplo, el aceite se puede someter a uno o más pasos de refino, que pueden incluir tratamiento ácido o desmucilagínación, tratamiento alcalino o eliminación de ácidos grasos libres, decoloración o eliminación de pigmentos, filtración, invernación (o enfriamiento, por ejemplo, para eliminar triglicéridos saturados), desodorización (o eliminación de ácidos grasos libres) y/o pulido (o eliminación de sustancias insolubles en aceite). Todos estos pasos de refino se describen más detalladamente en la solicitud PCT/EP01/08902, y se pueden aplicar a los pasos descritos en la presente solicitud *mutatis mutandis*.

El aceite resultante es particularmente adecuado para fines nutricionales, y puede añadirse a alimentos (para humanos) o a productos alimenticios (para animales). Los ejemplos incluyen leche, preparados para lactantes, bebidas saludables, pan y piensos.

Células microbianas

Las células microbianas (o microorganismos) que se utilizan en la presente invención, pueden ser cualquiera de las descritas anteriormente, especialmente en la sección referente a AGPI y aceites microbianos. Éstas pueden comprender, o ser capaces de producir, un AGPI o aceite microbiano, y, convenientemente, el aceite que contiene AGPI puede extraerse o aislarse de las células. Pueden estar en forma de filamentos, como hongos o bacterias, o como células individuales, como levaduras, algas y bacterias. Las células pueden comprender microorganismos que son levaduras, hongos, bacterias o algas. Se prefieren los hongos del orden de *Mucorales*, por ejemplo, los hongos pueden ser del género *Mortierella*, *Phycomyces*, *Blakeslea* o *Aspergillus*. Se prefieren los hongos de las especies *Mortierella alpina*, *Blakeslea trispora* y *Aspergillus terreus*.

En cuanto a las levaduras, son, preferentemente, del género *Pichia* (tal como de la especie *Pichia ciferrii*) o *Saccharomyces*.

Las bacterias pueden ser del género *Propionibacterium*.

Si las células provienen de un alga, ésta es, preferentemente, una dinoflagelada y/o pertenece al género *Crypthecodinium*. Se prefieren las algas de la especie *Crypthecodinium cohnii*.

Calentamiento

Se puede llevar a cabo por calentamiento (de las células) directo o indirecto. El calentamiento, si es directo, puede ser mediante el paso de vapor a través del fermentador. Un método indirecto puede utilizar intercambiadores de calor, bien a través de la pared del fermentador, o con serpentines calentadores, o con un intercambiador de calor externo, tal como un intercambiador de calor de placas.

Normalmente, la pasteurización tendrá lugar en el recipiente de fermentación en el cual se ha realizado la fermentación. Sin embargo, para algunos organismos (tales como bacterias) a menudo se prefiere eliminar antes las células del recipiente y después pasteurizar. La pasteurización puede tener lugar antes de otro procesado de los organismos, por ejemplo secado o granulación.

La pasteurización, normalmente, matará a la mayoría de, si no a todos, los microorganismos. Tras la pasteurización, al menos el 95% o incluso el 98% de los microorganismos han sido eliminados, es decir, no están vivos.

Acidificación

En algunos casos es conveniente reducir el riesgo de crecimiento de las células pasteurizadas. Una posibilidad es acidificar las células con un ácido adecuado. Así pues, para prevenir el crecimiento de las especies microbianas, puede ser conveniente ajustar el pH de las células a un intervalo de 3 a 4. Sin embargo, se pueden emplear intervalos de pH más amplios dependiendo de las células, y así el pH se puede ajustar de 2 a 5, de forma óptima a un intervalo de aproximadamente 3.3 a 3.7.

La acidificación de las células puede tener lugar antes de la pasteurización. Sin embargo, se realiza preferentemente después.

El pH se puede ajustar de cualquier forma conveniente, o con cualquier ácido adecuado. Preferentemente, esto se consigue utilizando ácido fosfórico, tal como al 85%, o diluido al 55%, o ácido fosfórico al 33%.

Índice de peróxidos (IP)

Preferentemente, el IP del aceite microbiano es de 4 a 8 ó 12, especialmente para un aceite crudo. Sin embargo, el IP puede ser menor de 3.0, 2.5 ó 2.0. Sin embargo, se pueden obtener valores de IP mucho más bajos utilizando el proceso de la invención, y estos valores pueden ser menores de 1.5 o menores de 1.0. Se pueden obtener valores de IP menores de 0.8 ó 0.6, e incluso menores de 0.4. Los valores (para las realizaciones) oscilaron entre 1.3 (o 0.8) y 0.4. La unidad (de IP) es generalmente meq/kg.

ES 2 320 645 T3

Índice de anisidina (IAN)

Este valor puede dar una medida del contenido de aldehídos. Preferentemente, el índice de anisidina del aceite microbiano es de 5, 6, 7 ó 10 a 15, 20 ó 25, especialmente para un aceite crudo. Convenientemente, el IAN es menor de 20, por ejemplo, menor de 15. Puede ser no mayor de 10 o incluso no mayor de 5. Preferentemente, los valores del IP y/o del IAN hacen referencia al aceite crudo más que al refinado. Los valores de IAN (en los experimentos preferidos) oscilaron entre 15 y 5, opcionalmente entre 12 y 7.

Aceites crudos frente a refinados

Se presentan a continuación algunas diferencias entre estos dos aceites. Cada aceite crudo o refinado puede tener una o más de las características de la siguiente tabla para el aceite crudo o refinado, según sea oportuno. Un aceite crudo contendrá normalmente un antioxidante (p. ej., tocoferol, palmitato de ascorbilo).

| Sustancia | Preferido (para el crudo) | Aceite crudo | Aceite refinado |
|--------------------------------------|---------------------------|--------------|------------------------|
| Insaponificables | ≤3.5% (p/p) | 2.5% (p/p) | 1.8 (p/p) |
| Disolvente (p. ej., hexano) | <2000 ppm | 100-2000 ppm | Indetectable o ≤ 1 ppm |
| Fosfolípidos % | | 2-3.5 | 0.05 |
| Ácidos grasos libres, como el oleico | <1% | 0.2% | 0.08% |
| IP | ≤10 meq/kg | 6 meq/kg | 1.4 meq/kg |
| Insolubles | <0.5% | 0.1% | — |
| Fósforo | <1000 mg/kg | 5 mg/kg | — |
| Silicio | <500 ppm | 100 ppm | 24 ppm |
| Arsénico | <0.5 mg/kg | <0.04 mg/kg | <0.5 mg/kg |
| Cadmio | <0.2 mg/kg | <0.02 mg/kg | <0.1 mg/kg |
| Mercurio | <0.04 mg/kg | <0.4 mg/kg | <0.04 mg/kg |
| Plomo | <0.1 mg/kg | <0.1 mg/kg | <0.1 mg/kg |
| Cobre | <0.2 mg/kg | <0.2 mg/kg | <0.02 mg/kg |
| Humedad y volátiles | <1.0% | 0.5 | <0.02% |
| Fosfátido (P/ppm) | | 50-100 | <10 |

ES 2 320 645 T3

Convenientemente, el aceite crudo de la presente invención puede tener una o más de las siguientes características:

- (a) un contenido de insaponificables de 2.0 a 3.5% (p/p);
- 5 (b) un contenido de disolvente (p. ej., hexano) de 10, 50 ó 100 ppm hasta 1000, 1500 ó 2000 ppm;
- (c) un contenido de ácidos grasos libres de 0.1 ó 0.2% a 1%, p. ej., 0.2-0.6 ó 0.3-0.5%;
- (d) un valor de IP de 2, 3, 4 ó 6 a 10;
- 10 (e) un contenido de fósforo de al menos 2, 3 ó 5 mg/kg;
- (f) un contenido de silicio de 50 ó 100 ppm a 50 ppm; y/o
- 15 (g) un contenido de agua menor del 1%, o de 0.5 a 1 ó 2%.

Usos de aceites y AGPI

20 Un sexto aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende el aceite del quinto aspecto, y, cuando sea oportuno, una o más sustancias (adicionales). La composición puede ser un producto alimenticio, y/o un suplemento alimenticio para animales o humanos. En realizaciones de la invención que son para consumo humano, los aceites pueden resultar adecuados para el consumo humano, típicamente mediante el refinado o purificación del aceite obtenido de los microorganismos.

25 La composición puede ser un preparado para lactantes o un producto alimenticio (para humanos). Se puede ajustar la composición del preparado de forma que tenga una cantidad similar de lípidos o AGPI a la leche materna natural. Esto puede comprender mezclar el aceite microbiano de la invención con otros aceites para conseguir la composición adecuada.

30 La composición puede ser una composición de piensos o un suplemento para animales o para especies marinas. Dichos piensos y suplementos se pueden suministrar a cualquier animal de una explotación agraria, en particular, a ganado ovino, bovino y avícola. Además, los piensos o suplementos se pueden suministrar a organismos marinos criados en piscifactorías, tales como peces y mariscos. La composición puede, por lo tanto, incluir una o más sustancias o ingredientes alimenticios para tales animales.

El aceite de la invención puede venderse directamente como un aceite contenido en un envase apropiado, típicamente, botellas de aluminio de una pieza recubiertas internamente con una laca epoxifenólica, y purgado con nitrógeno. El aceite puede contener uno o más oxidantes (p. ej., tocoferol, vitamina E o palmiato) cada uno, por ejemplo, a una concentración de 50 a 800 ppm, tal como de 100 a 700 ppm.

Se pueden incluir dentro de las composiciones adecuadas, composiciones farmacéuticas o veterinarias, p. ej., para administración oral, o composiciones cosméticas. El aceite puede tomarse como tal, o puede encapsularse, por ejemplo con una cubierta, y puede, por lo tanto, estar en forma de cápsulas. La cubierta o las cápsulas pueden contener gelatina y/o glicerol. La composición puede contener otros ingredientes, por ejemplo, saborizantes (p. ej., sabor a limón o lima), o un portador o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable.

Las peculiaridades o características preferidas de un aspecto de la invención son aplicables a otro aspecto *mutatis mutandis*.

50 La invención se describirá ahora, a modo de ejemplo, con referencia a los siguientes ejemplos, los cuales se proporcionan a modo de representación y no con la intención de limitar el alcance.

55 Ejemplo 1

Se cree que la actividad enzimática causa la oxidación durante la producción de un aceite microbiano que contiene AGPI. Se consideró la pasteurización como un método para estabilizar la oxidación durante el procesado de células microbianas para obtener el aceite microbiano. Se descubrió que el grado de estabilización era dependiente de las condiciones de pasteurización.

Así pues, se llevaron a cabo varios experimentos para determinar qué condiciones de pasteurización podrían afectar el nivel de oxidación, y, en particular, el índice de peróxidos (IP) del aceite. Los índices de peróxidos se determinaron utilizando el protocolo estándar detallado en AOCS:Cd8-53.

65 Los experimentos siguen el siguiente protocolo: fermentación; conservación; pasteurización; extracción (del aceite microbiano) y análisis del aceite.

ES 2 320 645 T3

El hongo *Mortierella alpina* se cultivó en un fermentador. La fermentación duró aproximadamente 148 horas. El *M. alpina* produjo el AGPI llamado ácido araquidónico (AA). La biomasa se eliminó del fermentador, y se conservó (a una temperatura menor de -18°C).

5 Las muestras de la biomasa de *M. alpina* se eliminaron del caldo de fermentación, mientras éste se encontraba aún dentro del fermentador, y se congelaron inmediatamente.

10 Se evaluaron varios protocolos de pasteurización. La pasteurización se llevó a cabo a tres temperaturas diferentes, a saber: 40, 70 y 85°C. El protocolo siguió un proceso de 3 etapas, con una primera etapa de calentamiento rápido, seguida de una meseta (una segunda etapa o etapa intermedia) a la temperatura deseada, que fue la máxima temperatura utilizada. Después, hubo una (tercera) etapa de enfriamiento rápido. Se sometieron diferentes muestras de la biomasa a una etapa (de meseta) intermedia con tres tiempos diferentes, a saber: una, dos y 24 horas.

15 Tras la pasteurización, el aceite microbiano se obtuvo utilizando una técnica de extracción por vía húmeda. Esta muestra de la biomasa se filtró, se prensó (bajo presión) y se extrajo el aceite.

20 El aceite microbiano se analizó posteriormente, fundamentalmente para obtener el índice de peróxidos (IP) utilizando un método de la AOCS. El contenido de AA se determinó para algunas de las muestras. Los análisis mostraron que el aceite microbiano obtenido contenía aproximadamente 420 g de AA por kg.

Protocolo detallado: fermentación y extracción de muestras

25 Se recogió un litro del caldo de fermentación del recipiente de fermentación y se filtró (filtro Seitz de dos litros, F-FA10). El residuo sólido resultante se lavó con 600 ml de agua desmineralizada. El residuo húmedo se secó durante 1 minuto con una corriente de aire caliente, y se prensó (utilizando un equipo HAFICO™, prensa de tintura, C-OAO21, 300-400 atm) a 400 bar. El extrudido húmedo se utilizó después para extraer un aceite microbiano con 500 ml de hexano (Merck) a temperatura ambiente (de 20 a 25°C) durante una hora utilizando un instrumento Ultra-Turrax™. El hexano se decantó. El residuo sólido restante se lavó con 250 ml de hexano fresco (con agitación, durante 30 minutos) a temperatura ambiente. El hexano se decantó y se añadió después al hexano extraído previamente.

35 Posteriormente, el extracto se filtró utilizando un filtro de vidrio combinado con un filtro de vidrio GFA. Después, el hexano se evaporó del extracto transparente, utilizando un instrumento Rotavapor™, a aproximadamente 50°C durante unos 15 minutos. El aceite se transfirió después a recipientes herméticos, y cada recipiente de la muestra se purgó con nitrógeno durante 30 segundos. Tras lo cual se cerraron los recipientes y se conservaron a -18°C.

Protocolos de pasteurización

40 Se evaluaron tres protocolos diferentes (A, B y C). Cada uno se componía de 3 etapas, una primera etapa de calentamiento, una segunda etapa de meseta (a una temperatura máxima) y una tercera etapa de enfriamiento. La Tabla 1 muestra, a continuación, los protocolos para los tres perfiles de pasteurización.

45

(Tabla pasa a página siguiente)

50

55

60

65

ES 2 320 645 T3

TABLA 1

| | Tiempo (t, min) | Temp. (T, °C) para el tiempo (t) | Etapas | Cambio de Temp. en la etapa (°C) | Tiempo por etapa (min) | Área bajo el perfil (°C.min) | Velocidad de calentamiento/enfriamiento (°C/min) | Tiempo para pasar de 40 a 70°C (min) | Tiempo conjunto de 40-70-40°C (min) | Área bajo la gráfica t frente a T (°C.min) |
|--|-----------------|----------------------------------|-------------|----------------------------------|------------------------|------------------------------|--|--------------------------------------|-------------------------------------|--|
| Perfil A | 0 | 25 | | | | | | | | |
| | 75 | 70 | Calentar | 45 | tcalent=75 | 1687.5 | 0.6 | 50 | | 7575 |
| | 135 | 70 | Pasteurizar | 0 | tpast=60 | 4200 | 0 | | | |
| | 210 | 25 | Enfriar | 45 | tenfri=75 | 1687.5 | 0.6 | 50 | 100 | |
| | | | | | | | | | | |
| Perfil B (no entra en la invención, para comparar) | 0 | 25 | | | | | | | | |
| | 102 | 72 | Calentar | 48 | tcalent=102 | 4896 | 0.46 | 65.11 | | 13 968 |
| | 162 | 72 | Pasteurizar | 0 | tpast=60 | 4320 | 0 | | | |
| | 360 | 28 | Enfriar | 48 | tenfri=198 | 4752 | 0.22 | 135 | 200.11 | |
| | | | | | | | | | | |
| Perfil C | 0 | 7 | | | | | | | | |
| | 25 | 70 | Calentar | 63 | tcalent=25 | 787.5 | 2.52 | 11.90 | | 5607.5 |
| | 85 | 70 | Pasteurizar | 0 | tpast=60 | 4200 | 0 | | | |
| | 105 | 8 | Enfriar | 62 | tenfri=208 | 620 | 3.10 | 9.68 | 21.58 | |
| | | | | | | | | | | |

Los tres perfiles de pasteurización A, B y C se muestran adicionalmente de forma gráfica en la Figura 1. Como se puede notar, el área bajo la gráfica de la temperatura (T, °C) frente al tiempo (t, minutos) se puede calcular para cada una de las tres etapas de cada perfil, y, después, se pueden sumar para dar el área total bajo la gráfica para cada uno de los tres perfiles. Estos cálculos se muestran adicionalmente en la Tabla 1 anterior.

El índice de peróxidos (IP) se determinó para los aceites resultantes de la extracción de las células, siguiendo los tres protocolos de pasteurización A, B y C. El IP para los aceites extraídos fue de 8.7, 14.3 y 2.4, respectivamente. El perfil B tenía velocidades de calentamiento y de enfriamiento lentas, y se presenta únicamente para comparar. Éste dio el IP más alt, 14.3.

Por el contrario, ambos perfiles A y C pertenecen a la invención. El perfil A tiene una velocidad de calentamiento y una velocidad de enfriamiento más rápidas para la primera y la tercera etapa que el perfil B. Preferentemente, en la invención, las velocidades de calentamiento y de enfriamiento son al menos tan rápidas como las que se muestran para el perfil A. El perfil A dio un IP de 8.7.

Sin embargo, se obtuvieron mejores resultados utilizando el perfil C, el cual tuvo un IP de sólo 2.4. Como se puede observar a la vista de la Figura 1, éste tuvo una etapa de calentamiento muy rápida y una (tercera) etapa de enfriamiento rápida.

Ejemplo 2

Se realizaron experimentos similares a los del Ejemplo 1, excepto que esta vez, la temperatura de pasteurización se varió mucho más, a saber: a 40°C (para comparar), 70°C y 85°C. El perfil de la temperatura (°C) frente al tiempo (minutos) se muestra, a continuación, en la Figura 2 y en la Tabla 2. El perfil fue esencialmente el mismo para todas las muestras, pero, por supuesto, con una prolongación de la meseta de pasteurización (de una hora a 4 ó 24 horas) según corresponda.

ES 2 320 645 T3

TABLA 2

| 40°C | | 70°C | | 85°C | |
|--------|-------------|--------|-------------|--------|-------------|
| Tiempo | Temperatura | Tiempo | Temperatura | Tiempo | Temperatura |
| 0 | 10.0 | 0 | 8.0 | 0 | 7.0 |
| 10 | 27.0 | 10 | 55.0 | 10 | 40.0 |
| 20 | 40.1 | 17 | 70.0 | 20 | 66.0 |
| 25 | 40.0 | 77 | 68.2 | 30 | 79.0 |
| 40 | 41.4 | 82 | 44.3 | 40 | 83.5 |
| 50 | 41.0 | 87 | 31.3 | 100 | 79.8 |
| 80 | 38.7 | 92 | 21.8 | 105 | 55.3 |
| 85 | 27.5 | 97 | 16.0 | 110 | 38.7 |
| 90 | 19.3 | 102 | 9.7 | 115 | 26 |
| 95 | 14.5 | | | 120 | 21.0 |
| 100 | 9.7 | | | 125 | 15.2 |
| 110 | 7.5 | | | 130 | 11.3 |

Se analizaron muestras de dos fermentaciones distintas (ambas de *M. alpina*) de diferente duración. Muestras del N° 11 al 20. La Tabla 3 tuvo una fermentación que duró un poco más, donde aproximadamente 2 m³ del caldo se transfirieron a un fermentador para inóculos, y la fermentación se prolongó durante 48 horas sin añadir más glucosa.

Tras la pasteurización, las muestras se procesaron, empezando por la filtración a una presión de aproximadamente 1 bar de nitrógeno. El residuo sólido resultante se lavó después con agua de proceso (aproximadamente 0.6 del volumen inicial del caldo). La deshidratación se llevó a cabo utilizando prensas para fruta ejerciendo una presión sobre el pistón de 300 a 400 bar. Posteriormente, se añadieron 500 ml de hexano fresco y se mezcló durante un minuto utilizando un instrumento Ultra-Turrax. Después, la extracción tuvo lugar durante aproximadamente una hora a temperatura ambiente. Tras la filtración, el residuo sólido resultante se lavó con 250 ml de hexano fresco, y el disolvente resultante se evaporó al vacío a 60-70°C. Se purgó después con nitrógeno y se conservó a -18°C.

Los resultados se muestran en la Tabla 3, la cual incluye el primer y el segundo índice de peróxidos medido, y la media de estos dos valores, así como el índice de anisidina (IAN). La disminución del IP y del IAN se muestran también en las Figuras 3 y 4 (para las fermentaciones de menor y de mayor duración, respectivamente).

ES 2 320 645 T3

TABLA 3

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

| Muestra N° | Tpast (oC) | tpast (h) | IP1 | IP2 | IPmedia | IAn |
|------------|------------|-----------|-----|------|---------|------|
| 1 | — | 0 | 6.0 | 5.4 | 5.7 | 25.7 |
| 2 | 40 | 1 | 8.8 | 8.5 | 8.6 | 25.9 |
| 3 | 40 | 4 | 3.8 | 3.8 | 3.8 | 27.1 |
| 4 | 40 | 24 | 2.1 | 2.2 | 2.1 | 21.0 |
| 5 | 70 | 1 | 2.2 | | 2.2 | 30.2 |
| 6 | 70 | 3.5 | 1.1 | 1.1 | 1.1 | 33.5 |
| 7 | 70 | 22 | 0.7 | 0.7 | 1.0 | 15.9 |
| 8 | 85 | 1 | 1.2 | 1.2 | 1.2 | 25.9 |
| 9 | 85 | 3.3 | 0.7 | 0.8 | 0.7 | 27.1 |
| 10 | 85 | 20.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 12.9 |
| 11 | — | 0 | 5.9 | 5.4 | 5.6 | 39.3 |
| 12 | 40 | 1 | 9.9 | 10.1 | 10.0 | 38.7 |
| 13 | 40 | 4 | 4.8 | 4.5 | 4.6 | 40.7 |
| 14 | 40 | 24 | 2.5 | 3.0 | 2.8 | 32.3 |
| 15 | 70 | 1 | 2.7 | 2.8 | 2.7 | 40.3 |
| 16 | 70 | 3.5 | 1.6 | 1.7 | 1.3 | 32.7 |
| 17 | 70 | 22 | 1.0 | 0.9 | 1.3 | 14.5 |
| 18 | 85 | 1 | 1.8 | 1.8 | 1.8 | 39.7 |
| 19 | 85 | 3.3 | 1.1 | 1.1 | 1.1 | 32.4 |
| 20 | 85 | 20.5 | 0.9 | 1.0 | 0.9 | 16.1 |

65 Se podrá observar a la vista de estos resultados que sin pasteurización, el IP fue de 5.6 ó 5.7. La pasteurización a 40°C disminuyó el IP, pero se requirió un tiempo relativamente largo (tal como 24 horas) a la temperatura de pasteurización para disminuir el IP hasta un valor aceptable de 2.1.

ES 2 320 645 T3

Se obtuvieron mejores resultados para temperaturas más altas. Por ejemplo, la pasteurización durante sólo 1 hora a 70°C dio un IP de 2.2, comparado con un IP de 2.1 durante 24 horas a 40°C. Incluso se obtuvieron mejores valores a temperaturas más altas, obteniendo un IP de sólo 1.2 a 85°C durante una hora. (Estas figuras se refieren a la fermentación de menor duración, aunque se pueden obtener resultados similares con células cultivadas durante la fermentación de mayor duración).

Así pues, las Figuras 3 y 4 muestran gráficamente como varían los valores de IP y de IAn con respecto a diferentes tiempos de pasteurización. Como cabía esperar, tiempos de pasteurización más largos dan valores de IP y de IAn menores. Sin embargo, tiene mayor importancia el uso de temperaturas relativamente altas durante la pasteurización. Cuando se aumentó la temperatura de pasteurización a 70°C, se observó una disminución marcada del IAn y del IP, y se dieron valores aún menores a 85°C. (Las tres líneas superiores, representadas por cruces, círculos rellenos y asteriscos muestran los valores de IAn, mientras que las tres líneas inferiores, representadas por diamantes, cuadrados y triángulos, dan los valores de IP).

La Tabla 4 muestra, a continuación, los cálculos del producto t.T (en °C.minuto) para los nueve protocolos de pasteurización diferentes (para 3 temperaturas de meseta diferentes y para tres tiempos diferentes). De hecho, este producto representa el área bajo la gráfica (del tiempo, t, minutos, frente a la temperatura, T, °C) para la etapa de meseta (después de la etapa de calentamiento, pero antes de la etapa de enfriamiento).

TABLA 4

| | Temp. (T, °C) | | | |
|----------------------|------------------|--------|---------|---------|
| | | 40 | 70 | 85 |
| Tiempo (t, h/min) | | | | |
| 1 (60) | | 2400 | 4200 | 5100 |
| 4 (240) | | 9600 | 16 800 | 20 400 |
| 24 (1440) | | 57 600 | 100 800 | 122 400 |

45 Ejemplo 3

Se realizaron más análisis de pasteurización utilizando el caldo de fermentación, obtenido tras la fermentación a escala de producción, utilizando el hongo *M. alpina*, como se utilizó previamente de ejemplo. El caldo sin pasteurizar (800 litros) se transportó y se conservó a 4°C. El caldo se transfirió después a un recipiente de 700 litros con agitación, y se llevaron a cabo 10 protocolos de pasteurización diferentes.

En primer lugar, la pasteurización se llevó a cabo a cinco temperaturas (máximas) diferentes, a saber: 140, 120, 100, 80 y 60°C, con un tiempo de permanencia (meseta) de 8 segundos (a temperatura máxima). En segundo lugar, la pasteurización se llevó a cabo a 140, 120, 100, 80 y 60°C con un tiempo de permanencia (meseta) de 300 segundos a temperatura máxima.

Se tomaron muestras (2 litros) y se congelaron directamente a -18°C. Se tomaron muestras estériles (de 200 ml) y se congelaron, y se obtuvo aceite crudo que contenía AA de las muestras utilizando el siguiente protocolo.

Se filtró una muestra del caldo de fermentación (1.7 litros) a 1 bar de N₂. El residuo sólido se lavó con 0.6 volúmenes de agua condensada, y se comprimió durante 5 minutos a 400 kg/cm². Posteriormente, se añadió n-hexano (500 ml) al residuo húmedo, y se granuló utilizando un instrumento Ultra-Turrax a 24.000 rpm. El aceite se extrajo a temperatura ambiente (aproximadamente 21°C) durante unos 110 minutos. La suspensión se filtró al vacío utilizando un medio para un filtro GF/A Whatman. El residuo se lavó con 250 ml de hexano fresco. El hexano se evaporó durante 15 minutos con un baño de agua a una temperatura de aproximadamente 60-70°C. El aceite resultante se transfirió después a recipientes de muestras herméticos, los cuales se purgaron con nitrógeno durante 30 segundos, después se cerraron y se conservaron a -18°C antes del análisis.

ES 2 320 645 T3

Las Figuras 5, 6 y 7 proporcionan los datos obtenidos tras el análisis. Las Figuras 6 y 7 muestran los perfiles del tiempo frente a la temperatura para las dos series de experimentos, en primer lugar, para el tiempo de meseta (permanencia) de 8 segundos, y, en segundo lugar, para el tiempo de meseta (permanencia) de 5 minutos, para cada una de las 5 condiciones de temperatura, respectivamente. Como se observa a la vista de las gráficas, la línea horizontal intermedia (que representa 8 segundos o 5 minutos) muestra la etapa de meseta.

La Figura 5 muestra los valores del IP y del IAn resultantes para los 10 regímenes de pasteurización. Como se puede observar, se obtuvieron valores de IP menores a temperaturas en aumento, y el mayor tiempo de residencia (5 minutos) dio el valor de IP más bajo.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 320 645 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un proceso para pasteurizar células microbianas, el cual comprende calentar las células de 40°C a 60°C en no más de 30 minutos o a una velocidad mayor de 0.5°C/minuto.
- 10 2. Un proceso para pasteurizar células microbianas, el cual comprende calentar las células utilizando un protocolo de pasteurización de forma que el área bajo la gráfica del tiempo (minutos) frente a la temperatura (°C) es menor de 13 000°C.minuto.
- 15 3. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 2, el cual comprende calentar las células de 40°C a 60°C en no más de 30 minutos o a una velocidad mayor de 0.5°C/minuto.
- 20 4. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, el cual comprende calentar las células y de esta manera mantener las células a una temperatura elevada (T, °C) durante un tiempo (t, minutos) en una etapa de meseta, en la cual el producto t.T es de 140 a 100.800°C.minuto.
- 25 5. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 4, en el cual el producto t.T es de 1000 a 6000°C.minuto.
- 30 6. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual las células microbianas se calientan de 40°C a 70°C en no más de 15 minutos y/o las células se calientan a una velocidad de al menos 0.6 ó 1.0°C/minuto.
- 35 7. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual las células se calientan a una temperatura mayor de 60°C.
- 40 8. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual las células se calientan a una temperatura dentro del rango de 100 a 180°C.
- 45 9. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, el cual comprende una (primera) etapa de calentamiento, una (segunda) etapa de meseta (en la cual las células se mantienen a temperatura constante) y una (tercera) etapa de enfriamiento.
- 50 10. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual las células se calientan a una temperatura inicial menor de 40°C.
- 55 11. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual las células se enfrían a una velocidad de al menos -0.6°C/minuto.
- 60 12. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual las células comprenden, o producen, un AGPI o un aceite microbiano (que contiene opcionalmente AGPI).
- 65 13. Un proceso para obtener un AGPI o un aceite microbiano a partir de células microbianas, el cual comprende pasteurizar las células, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, y extraer o aislar de las células pasteurizadas un AGPI o un aceite microbiano.
14. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 13, en el cual el aceite microbiano comprende un AGPI.
15. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14, en el cual el AGPI tiene al menos 18 átomos de carbono y al menos 3 dobles enlaces.
16. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 15, en el cual el AGPI es el ácido araquidónico (AA).
17. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en el cual el aceite se extrae de las células microbianas pasteurizadas utilizando un disolvente.
18. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 17, en el cual el aceite se extrae para obtener un aceite crudo que contiene AGPI, y donde el aceite crudo que contiene AGPI se somete a uno o más pasos de refino.
19. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 18, en el cual uno o más pasos de refino incluyen tratamiento ácido o desmucilaginación, tratamiento alcalino o eliminación de ácidos grasos libres, decoloración o eliminación de pigmentos, filtración, invernación, desodorización y/o pulido.
20. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19, en el cual el aceite resultante se añade a alimentos para humanos o productos alimenticios para animales.
21. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 20, en el cual el aceite resultante se añade a preparados para lactantes.

ES 2 320 645 T3

22. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual las células son bacterias, algas, hongos o células de levadura.

5 23. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual las células son del género *Mortierella*.

24. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual las células son de la especie *Mortierella alpina*.

10 25. Un aceite microbiano que comprende al menos el 35% de un AGPI de interés, y tiene un índice de anisidina (IAN) menor de 25.

26. Un aceite de acuerdo con la reivindicación 25, en el cual el AGPI de interés es el ácido araquidónico (AA).

15 27. Un aceite de acuerdo con la reivindicación 25 ó 26, que tiene un índice de anisidina de 5 a 25.

28. Un aceite de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 25 a 27, que tiene un índice de anisidina menor de 20.

20 29. Un aceite de acuerdo con la reivindicación 28, que tiene un índice de anisidina menor de 15.

30. Un aceite de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 25 a 29, que tiene un contenido de triglicéridos de al menos el 90%.

25 31. Un aceite de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 25 a 30, que tiene un IP menor de 12.

32. Un aceite de acuerdo con la reivindicación 31, que tiene un IP menor de 1.5.

33. Un aceite de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 25 a 32, que ha sido producido por un hongo.

30 34. Un aceite de acuerdo con la reivindicación 33, en el cual el hongo es del género *Mortierella*.

35. Un aceite de acuerdo con la reivindicación 34, en el cual el hongo es de la especie *Mortierella alpina*.

35 36. Un aceite de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 25 a 35, en el cual dicho aceite es un aceite crudo o no refinado.

37. Un proceso que comprende someter el aceite, de acuerdo con la reivindicación 36, a uno o más pasos de refino.

40 38. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 37, en el cual los pasos de refino incluyen el tratamiento ácido o desmucilagínación, tratamiento alcalino o eliminación de ácidos grasos libres, decoloración o eliminación de pigmentos, filtración, invernación, desodorización y/o pulido.

45 39. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 37 ó 38, que comprende añadir el aceite resultante a alimentos para humanos o productos alimenticios para animales.

40. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 37 a 39, que comprende añadir el aceite resultante a preparados para lactantes.

50 41. Un producto alimenticio y/o suplemento alimenticio, que comprenden el aceite de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 25 a 35, o el aceite refinado de acuerdo con el proceso de las reivindicaciones 37 ó 38.

42. Un producto alimenticio de acuerdo con la reivindicación 41, en el cual el producto alimenticio es un preparado para lactantes.

55 43. Un producto alimenticio y/o suplemento alimenticio de acuerdo con la reivindicación 42, en el cual el producto alimenticio es una composición de piensos o suplemento para animales o para especies marinas.

60

65

Figura 1

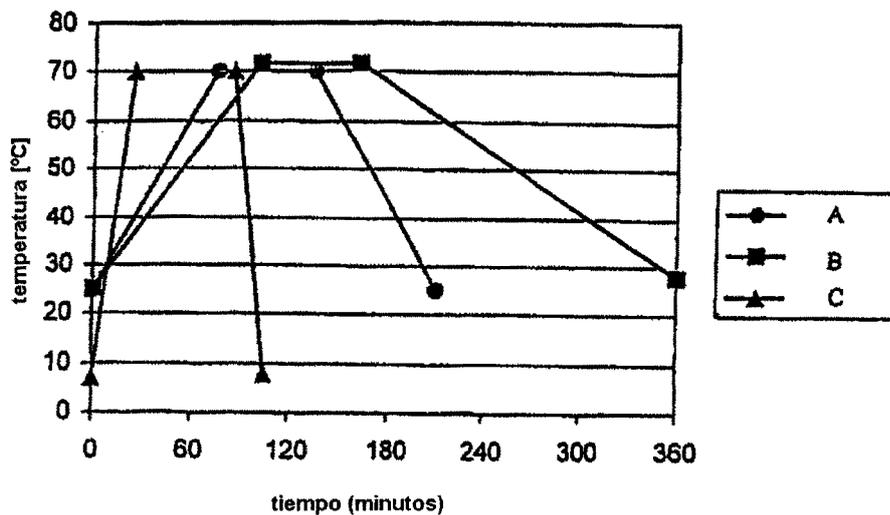


Figura 2

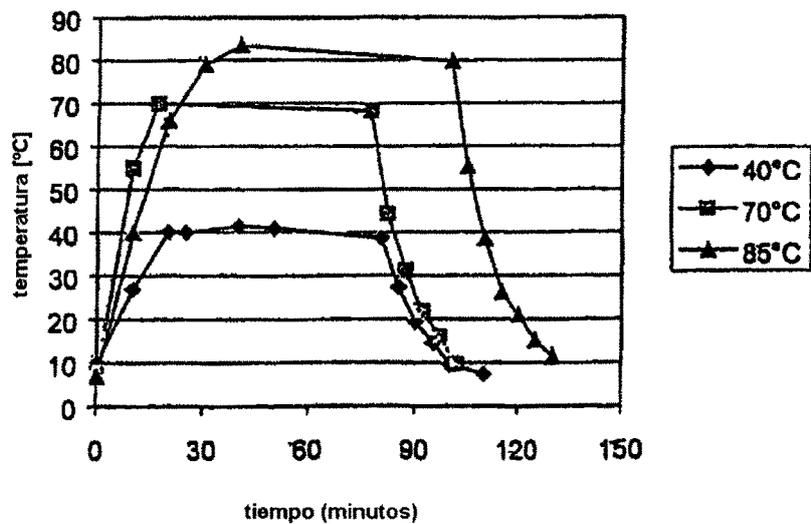


Figura 3

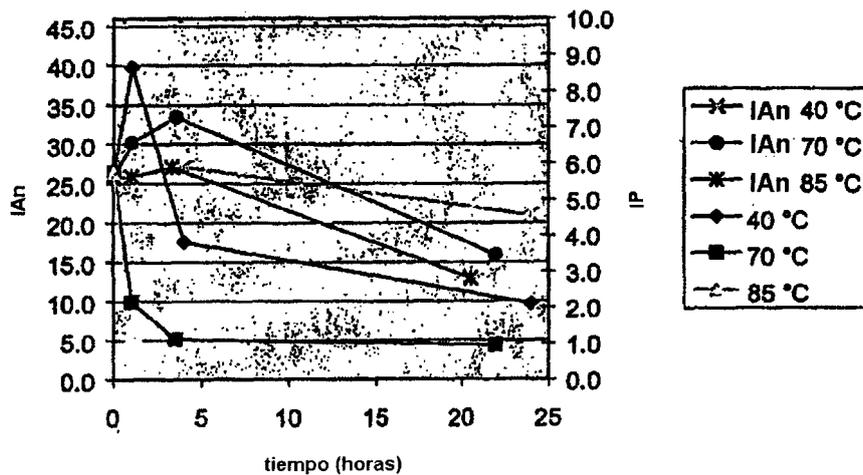
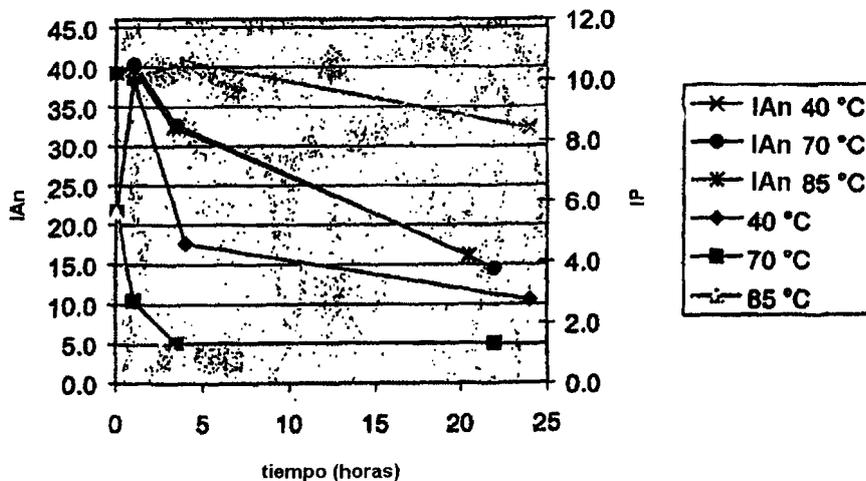


Figura 4



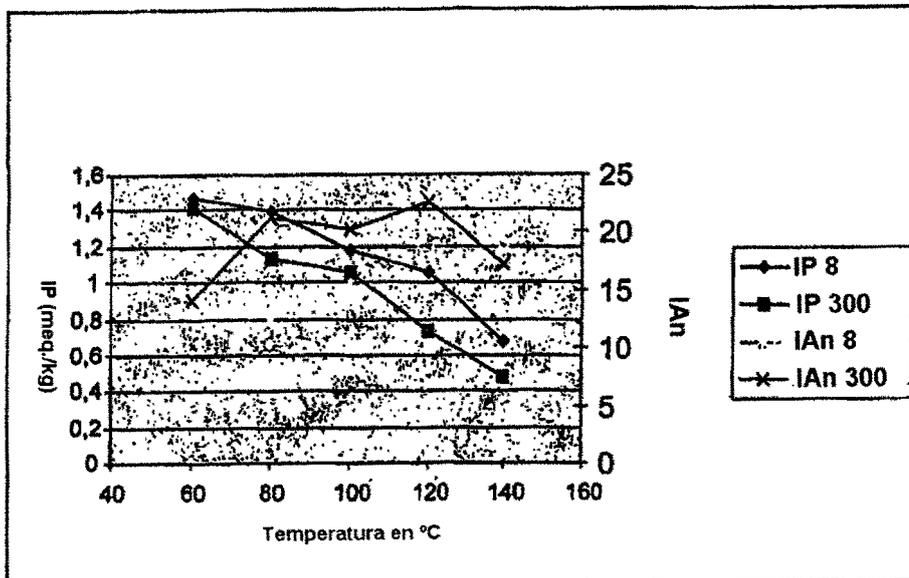


Figura 5

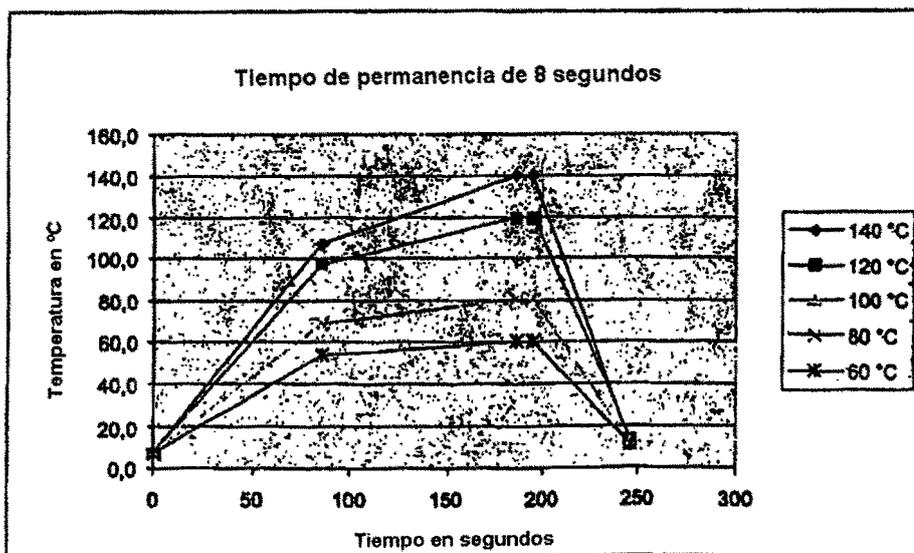


Figura 6

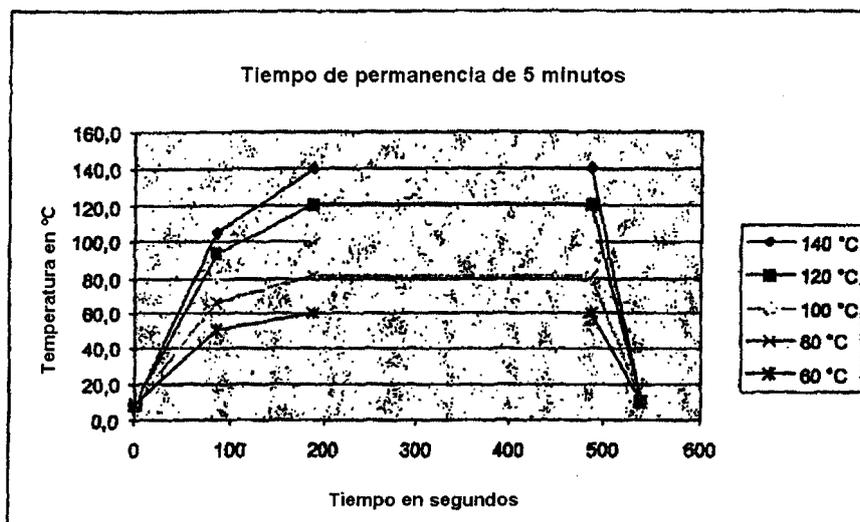


Figura 7