(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 456 869**

(51) Int. Cl.:

C12P 7/64	(2006.01)	*C11B 1/00*	(2006.01)
C12N 1/00	(2006.01)		
C12P 1/00	(2006.01)		
C12P 1/02	(2006.01)		
C12N 1/04	(2006.01)		
C12N 1/14	(2006.01)		
C12N 1/12	(2006.01)		
A61K 31/00	(2006.01)		
A23L 1/00	(2006.01)		
A23K 1/00	(2006.01)		

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.02.2006** **E 10010293 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.04.2014** **EP 2333094**

(54) Título: **Producción de ácidos grasos poliinsaturados usando un nuevo procedimiento de tratamiento celular**

(30) Prioridad:

08.02.2005 JP 2005031918

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.04.2014

(73) Titular/es:

NIPPON SUISAN KAISHA, LTD. (100.0%)
6-2 Ohtemachi 2-chome
Chiyoda-ku, Tokyo 100-8686, JP

(72) Inventor/es:

HIGASHIYAMA, KENICHI y
NAKAJIMA, TOSHIHARU

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 456 869 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

Producción de ácidos grasos poliinsaturados usando un nuevo procedimiento de tratamiento celular

Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a una biomasa microbiana que contiene microorganismos que producen un compuesto que comprende un ácido graso poliinsaturado como ácido graso constituyente, un aceite bruto y/o fosfolípidos bruto que se obtiene mediante extracción de la biomasa, y un procedimiento para la producción de un aceite refinado y/o fosfolípido refinado que se obtiene mediante purificación de un aceite bruto y/o fosfolílpido bruto, así como a alimentos y bebidas, suplemento nutritivos terapéuticos, piensos y preparados farmacéuticos que incorporan la biomasa, grasas o aceites (aceites brutos y/o aceites refinados) y/o fosfolípidos (fosfolípidos brutos y/o fosfolípidos refinados).

Técnica antecedente

La biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados (de aquí en adelante, "AGPI") humanos se produce en dos series representativas, las series ω3 y ω6 (donde ω representa el número de la posición del átomo de carbono que tiene el primer enlace doble, contando desde el extremo del grupo metilo del ácido graso), y en el caso de los ácidos grasos ω6, por ejemplo, el ácido linoleico (18:2 ω6) se convierte en ácido γ-linolénico (18:3 ω6), ácido dihomo-γ-linolénico (20:3 ω6), ácido araquidónico (20:4 ω6) y ácido 4,7,10,13,16-docosapentaenoico (22:5 ω6) mediante insaturación repetida y alargamiento de la cadena de carbono.

De manera similar, en el caso de los ácidos grasos ω3, el ácido α-linolénico (18:3 ω3) se convierte en ácido eicosapentaenoico (20:5 ω6), ácido 7,10,13,16,19-docosapentaenoico (22:5 ω3) (ácido docosapentaenoico) y ácido 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico (22:6 ω3) (ácido docosahexaenoico), mediante insaturación repetida y alargamiento de la cadena de carbono. Se sabe que el AGPI ω3, ácido eicosapentaenoico (de aquí en adelante, "EPA") y ácido docosahexaenoico (de aquí en adelante, "DHA") en particular tienen numerosas funciones fisiológicas que incluyen efectos profilácticos frente a enfermedades de adultos tales como arterioesclerosis y trombosis o efectos anticáncer, así como efectos de refuerzo del aprendizaje, y se han hecho diversos intentos para utilizarlos en preparados farmacéuticos y alimentos para usos específicos sobre la salud. Sin embargo, los AGPI distintos de los de tipo ω3 (tales como los ω6 y ω9) también han sido objeto de atención recientemente.

El ácido araquidónico constituye aproximadamente 10% de los ácidos grasos que componen los órganos vitales tales como la sangre y el hígado (por ejemplo, la relación de composición de ácidos grasos de los fosfolípidos en la sangre humana es 11% de ácido araquidónico, 1% de ácido eicosapentaenoico, 3% de ácido docosahexaenoico), y como componente estructural principal de membranas celulares, contribuye a modular la fluidez de las membranas y ejerce diversas funciones metabólicas, al tiempo que desempeña también un papel importante como precursor directo de prostaglandinas. Recientemente se han destacado los papeles del ácido araquidónico como nutriente de niños lactantes y como ácido graso constituyente de cannabinoides endógenos que exhiben efectos neuroactivadores (monoglicerol de 2-araquidonoilo, anandamida). Normalmente, la ingestión de alimentos ricos en ácido linoleico conduce a su conversión en ácido araquidónico, pero como las funciones de las enzimas implicadas en su biosíntesis están reducidas en los pacientes de enfermedades relacionadas con el estilo de vida y en las afecciones preliminares así como en los niños y en los ancianos, dichos individuos tienden a ser deficientes en ácido araquidónico; por lo que ha sido deseable proporcionar medios para su ingestión directa en forma de un ácido graso constituyente de grasas o aceites (triglicéridos).

Aunque los aceites de pescado son fuentes abundantes de AGPI ω3 tales como EPA y DHA, los AGPI ω6 tales como ácido γ-linolénico, ácido dihomo-γ-linolénico, ácido araquidónico y ácido 4,7,10,13,16-docosapentaenoico (22:5 ω6) prácticamente no se pueden obtener de fuentes tradicionales de grasa y aceite, y por tanto, en los momentos actuales, se usan lo más comúnmente grasas y/o aceites que comprenden AGPI como ácidos grasos constituyentes (que se denominarán de aquí en adelante grasas y/o aceites que contienen AGPI) que se obtienen mediante fermentación con microorganismos. Por ejemplo, se han propuesto procedimientos para obtener grasas y/o aceites que comprenden ácido araquidónico como ácido graso constituyente (que se denominarán de aquí en adelante "grasas y/o aceites que contienen ácido araquidónico") mediante el cultivo de diversos microorganismos capaces de producir grasas y/o aceites que contienen ácido araquidónico.

Se sabe que se pueden obtener grasas y aceites que tienen una proporción alta de ácido araquidónico que constituye la porción de ácido graso (que se denominará de aquí en adelante "grasas y/o aceites ricas en ácido araquidónico") usando microorganismos que pertenecen al género *Mortierella* (publicación de patente japonesa pendiente de examen SHO Nº 63-44891, publicación de patente japonesa pendiente de examen SHO Nº 63-12290). En los últimos años, uno de los usos esenciales del ácido araquidónico está en el campo de la nutrición de niños lactantes, por ejemplo, y específicamente implica el uso de grasas y/o aceites que contienen ácido araquidónico que se obtiene mediante fermentación en la fórmula infantil. También se han puesto de manifiesto nuevos efectos de grasas y/o aceites que contienen ácido araquidónico (publicación de patente japonesa pendiente de examen SHO Nº 2003-48831: Composition with prophylactic or ameliorative effect on symptoms and conditions associated with brain function impairment), y se espera que aquellas tendrán demanda alta en el futuro.

Las grasas y/o aceites que se obtienen mediante el cultivo de microorganismos de *Mortierella* consisten ampliamente en triglicéridos (aproximadamente 70% o mayor) y fosfolípidos. Las grasas y/o aceites comestibles están en forma de triglicéridos, y para el propósito del uso anteriormente descrito, las grasas y/o aceites originales producidos por las células (grasas y aceites que se obtienen mediante extracción desde células, conocidos como "aceite bruto") se extraen de la biomasa celular resultante del cultivo de los microorganismos, y a continuación los aceites brutos se someten a etapas de refinado de grasa/aceite comestible (desengomado, desoxidación, desodorización y decoloración) para obtener grasas y/o aceites refinados sin los fosfolípidos.

Dado que las grasas y/o aceites que contienen AGPI que se obtienen mediante el cultivo de microorganismos de *Mortierella* se acumulan en los micelios, el cultivo se tiene que llevar a cabo a una concentración más alta para aumentar el rendimiento de las grasas y/o aceites que contienen AGPI por cultivo, para la optimización económica de la producción de grasa/aceite. El rendimiento por cultivo de la grasa y/o aceite que contiene AGPI es el producto de la concentración celular o micelial y el contenido de grasa/aceite que contiene AGPI por micelio, y es necesario por tanto aumentar ambos, la concentración celular y el contenido en grasa/aceite que contiene AGPI por cultivo. La concentración celular se puede aumentar elevando la concentración de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo que se convierte normalmente en componentes celulares. El contenido en grasa/aceite que contiene AGPI por micelio solamente se puede aumentar controlando satisfactoriamente la forma celular y llevando a cabo la fermentación en presencia de oxígeno adecuado. Los procedimientos reseñados para controlar la forma celular incluyen la optimización de la composición del medio salino (re-publicación doméstica japonesa Nº 98/029558), mientras los procedimientos para suministrar oxígeno incluyen procedimientos presurizados de cultivo y procedimientos de cultivo aeróbico enriquecido en oxígeno (publicación de patente japonesa pendiente de examen HEI Nº 06-153970).

Asimismo se han reseñado intentos para mejorar no solo el procedimiento de cultivo sino también el procedimiento de recuperación celular tras el cultivo. Por ejemplo, un procedimiento reseñado implica obtener una biomasa microbiana (contenido en humedad de 25-75%) y granularla en partículas granulares al tiempo que se mantiene el contenido en humedad, y secándola a continuación hasta un contenido en humedad por debajo de 20%, de modo que la granulación no solo facilita el secado sino también la extracción del compuesto diana (WO97/36996). Esta publicación enseña que se prefiere un procedimiento de extrusión para moldeo en partículas granulares, si bien los procedimientos de extrusión ordinarios no alteran el contenido en humedad en general.

Las partículas granulares se secan, por ejemplo, mediante secado por atomización, secado en lecho fluidizado, secado por liofilización, secado en cinta o secado al vacío. Otro procedimiento conocido es aquel en que se filtra una disolución del cultivo de un hongo filamentoso de *Mortierella* para recoger las células, que se secan y se desintegran a continuación, y se extraen las grasas y/o aceites usando un disolvente orgánico (CN1323904A), mientras Yamada el al., han reseñado un procedimiento de desintegración que usa un molino de bolas ("Industrial applications of single cell oils", publicado por D.J. Kyle y C. Ratledge, AOCS press (1992). p. 118-138).

De modo similar, el documento EP 0990694 A1 describe un procedimiento para extraer componentes liposolubles contenidos en células microbianas, en donde las células microbianas que se secan hasta un contenido en humedad no mayor de 20% se someten a destrucción y moldeado mediante uso de una extrusora y a continuación se someten a extracción del componente liposoluble mediante uso de un disolvente orgánico.

El documento EP 0522470 A1 describe un procedimiento para preparar fragmentos celulares secos que contienen triglicéridos en los que el contenido de ácidos grasos poliinsaturados se disminuye no más de un 10% en peso después del tratamiento por calor, y las células microbianas se rompen al tiempo que se dispersan en agua y a continuación se deshidratan. A continuación se extraen los triglicéridos con un disolvente tal como n-hexano con la intención primaria de producir una composición de pienso para animales.

El documento WO 01/54510 A1 describe un proceso para producir lípidos que contienen ácidos grasos polienoicos a partir de microorganismos eucariotas capaces de producir al menos 20% de su biomasa como lípidos. El proceso incluye una etapa de aumento de la densidad de la biomasa, en donde se añaden al medio de fermentación una fuente de carbono no alcohólico y una fuente de nutriente limitada, y una etapa de producción que induce la producción de lípido. Después del secado, los lípidos, de los que al menos 15% son poliinsaturados, se recuperan a continuación mediante desintegración de células a la que sigue separación por gravedad.

Así pues, aunque se han publicado diversos procedimientos de recuperación celular diferentes, el secado se realiza invariablemente mediante una etapa única de secado convencional, por lo que se puede considerar que no se ha desvelado ningún desarrollo de uso de secadores nuevos ni de uso de secadores convencionales múltiples. Además, no se ha descrito un procedimiento para el procesado de biomasa microbiana seca.

A pesar del hecho de que el procedimiento de recuperación celular es extremadamente importante desde el punto de vista de la pérdida o reducción de las grasas y/o aceites microbianos y de la calidad de la grasa/aceite microbiano en la producción de la grasa/aceite microbiano, actualmente no se puede encontrar prácticamente ninguna publicación que se refiera al desarrollo de procesos de este tipo.

Los procesos de secado se pueden clasificar generalmente en tres etapas o períodos ("Shokuhin Kogaku Kiso Koza

(6) Concentration and drying", R. Matsuno et all., Korin Press (1988), Chap. 5). En primer lugar, si el material tiene un contenido en humedad adecuado, la evaporación de agua del material se considera que es equivalente a la evaporación de agua de las superficies de gotas de agua, y la temperatura del material se desplazará hacia la temperatura del bulbo húmedo durante un período conocido como período de pre-calentamiento. Después de que el material haya alcanzado la temperatura del bulbo húmedo, la cantidad de calor que entra desde el aire se consume completamente en la evaporación de la humedad, y por lo tanto el contenido en humedad del material disminuye en proporción directa al tiempo. El período de velocidad de secado constante se denomina período de velocidad de secado constante. Con el secado adicional, la migración de agua dentro del material llega a ser el factor que limita la velocidad, de manera que la velocidad de evaporación de humedad disminuye y el contenido en humedad alcanza el equilibrio con el aire seco, haciendo que el secado cese finalmente. Este período se conoce como el período de caída de la velocidad de secado.

Los procedimientos prácticos de secado se pueden dividir ampliamente en procedimiento de calentamiento por convección, procedimientos de calentamiento por conducción y procedimientos de calentamiento por radiación. Los procedimientos de calentamiento por radiación conocidos incluyen procedimientos de radiación infrarroja, pero tales procedimientos no se emplean comúnmente para el procesado de alimentos, que implica tratamiento en masa a gran escala, y se usan más ampliamente en su lugar los procedimientos de calentamiento por convección y conducción.

Un secador del tipo de calentamiento por convección suministra aire caliente para retirar rápidamente la humedad que se evapora de los alrededores de la materia prima, y así fomenta poderosamente la evaporación de humedad; por lo tanto, es un medio eficaz para conseguir la reducción masiva del contenido en humedad. Por otra parte, sin embargo, el gran suministro de aire caliente produce dispersión de polvo del material secado y eleva los costes de energía para los ventiladores, al tiempo que las materias primas con altos contenidos en humedad conducen a problemas tales como la formación de grumos debida a la adhesión entre los materiales, y a que se reduzca el área de contacto con el aire caliente.

Un secador del tipo de calentamiento por conducción puede conseguir eficiencia térmica alta con un flujo de aire prácticamente nulo, y por lo tanto los costes de energía de soplado y la dispersión de polvo de materia prima se pueden reducir enormemente. Por otra parte, sin embargo, el calentamiento se produce mediante conducción de calor en solitario y de este modo ha sido difícil realizar el secado hasta un contenido bajo en humedad.

Publicación de patente japonesa pendiente de examen SHO Nº 63-44891

Publicación de patente japonesa pendiente de examen SHO Nº 63-12290

Publicación de patente japonesa pendiente de examen Nº 2003-48831

Publicación de patente japonesa pendiente de examen HEI Nº 06-153970

Re-publicación doméstica japonesa Nº 98/029558

WO97/36996

CN1323904A

Industrial applications of single cell oils, publicado por D.J. Kyle y C. Ratledge, AOCS press (1992). p. 118-138

Shokuhin Kogaku Kiso Koza (6) "Concentration and drying", R. Matsuno et all., Korin Press (1988), Chap. 5)

Descripción de la invención

Así pues, en consideración del comportamiento de la humedad durante los tres períodos del proceso de secado, el período de pre-calentamiento, el período de velocidad de secado constante y el período de caída de la velocidad de secado, es muy deseable desarrollar un proceso novedoso adecuado para secado de biomasas microbianas, que esté basado en un examen completo de las ventajas y desventajas de los secadores clasificados ampliamente como sistemas de calentamiento por convección y/o sistemas de calentamiento por conducción.

Los inventores de la presente han llevado a cabo una investigación diligente sobre procedimientos para recuperar biomasas microbianas durante la producción de grasa y/o aceite que contiene AGPI mediante fermentación microbiana, y han descubierto que empleando varios medios basados en diferentes principios, y particularmente una combinación de un sistema de calentamiento por conducción y un sistema de calentamiento por convección, para la etapa de secado, se pueden utilizar las ventajas de cada uno de los sistemas de calentamiento para resolver los inconvenientes y mejorar significativamente la economía de la etapa de secado. Se descubrió además que enfriando los micelios secos durante el período después del secado y antes del llenado y del empaquetado, es posible obtener un aceite bruto que contiene AGPI de la calidad deseable.

Por lo tanto, en este documento se describen un procedimiento de secado novedoso que incorpora una pluralidad de procedimientos, así como un procedimiento para producción y un procedimiento para almacenamiento de grasas y/o

aceites (triglicéridos) que contienen AGPI y/o fosfolípidos que contienen AGPI y micelios que contienen AGPI caracterizados por llenar y empaquetar micelios secos después de enfriarlos.

Específicamente, la presente invención según la reivindicación 1 proporciona un procedimiento para aislar un compuesto o más de un compuesto de una biomasa microbiana que contiene microorganismos que han producido el compuesto o compuestos, comprendiendo el procedimiento las siguientes etapas:

(a) preparar u obtener células húmedas que tienen un contenido en humedad promedio entre 30% y 80%;

(b) someter a las células húmedas a secado primario usando un sistema de calentamiento por conducción del tipo de transportador de adhesión térmica para obtener células secas primarias en forma de escamas y que tienen un contenido en humedad promedio entre 5% y 50%;

(c) someter a las células secas primarias que se han obtenido en (b) a secado secundario usando un sistema de calentamiento por convección para obtener células secas secundarias que tienen un contenido en humedad promedio no mayor de 10%; y

(d) extraer o aislar, purificar y/o refinar el compuesto o cada uno de los compuestos de las células secas secundarias que se han obtenido en (c).

En el procedimiento anteriormente descrito, el secado primario en (b) se realiza con un sistema de calentamiento por conducción, que es preferiblemente un secador de mezclado cónico de husillo, un secador de transferencia de calor por conducción, un secador de tambor, o un secador de ciclón. El secado secundario en (c) se realiza con un sistema de calentamiento por convección tal como, por ejemplo, secador de lecho fluidizado vibrante, o secador de lecho fluidizado continuo horizontal, un secador rotatorio, un secador de flujo paralelo de tipo caja, un secador de flujo de aire de tipo caja, un secador/enfriador vibrante, un secador de lecho fluidizado, un secador de flujo de aire de tipo banda o un secador de banda. Preferiblemente, las células húmedas en (a) se obtienen mediante separación sólido/líquido de una disolución de cultivo, y la separación sólido/líquido preferiblemente se lleva a cabo de modo simultáneo con una deshidratación mecánica.

La biomasa, por ejemplo, contiene un hongo o se deriva de un hongo. El hongo puede ser, por ejemplo, uno que pertenezca al orden de *Mucorales* y al género de *Mortierella*, tal como *Mortierella alpina*.

La biomasa puede contener un alga o puede derivarse de un alga. El alga puede pertenecer, por ejemplo, al género *Chypthecodinium, Thraustochytrium, Schizochytrium, Ulkenia, Japonochytrium* o *Haliphthoros*.

Por ejemplo, el alga puede ser *Crypthecondium cohnii*.

El compuesto es preferiblemente una grasa o aceite que comprende un ácido graso poliinsaturado como ácido graso constituyente, donde el ácido graso poliinsaturado es un ácido graso ω3, ω6 y/u ω9 C18 o superior que tiene dos o más enlaces dobles, y por ejemplo, ácido α-linolénico (ácido 9, 12, 15-octadecatrienoico), ácido 6, 9, 12, 15-octadecatetraenoico (18:4ω3), ácido 8, 11, 14, 17-eicosatetraenoico (20:4ω3), EPA (ácido 5, 8, 11, 14, 17-eicosapentaenoico), DPAω3 (ácido 7, 10, 13, 16, 19-docosapentaenoico), DHA (ácido 4, 7, 10, 13, 16, 19-docosahexaenoico), ácido γ-linolénico (ácido 6, 9, 12-octadecatrienoico), ácido dihomo-γ-linolénico (ácido 8, 11, 14-eicosatrienoico), ácido araquidónico (ácido 5, 8, 11, 14-eicosatetraenoico), ácido 7, 10, 13, 16-docosatetraenoico, (22:4ω6), DPAω6 (ácido 4, 7, 10, 13, 16-docosapentaenoico), ácido 6, 9-octadecadienoico (18:2ω9), ácido 8, 11-eicosadienoico (20:2ω9) y/o ácido de Mead (ácido 5, 8, 11-eicosatrienoico).

Según un modo preferido del procedimiento anteriormente descrito, las células secas secundarias que se obtienen en la etapa (c) se suministran a la etapa (d) después de tratamiento de enfriamiento mediante uno de los siguientes procedimientos:

(i) enfriamiento al menos a 60ºC suministrando aire que tiene una composición con una concentración de oxígeno no mayor de 21%; o

(ii) enfriamiento al menos a 60ºC mediante enfriamiento estático en una atmósfera de aire que tiene una composición con una concentración de oxígeno no mayor de 21%.

Las células secas secundarias enfriadas se pueden almacenar mediante uno de los siguientes procedimientos:

(I) llenando las células en un recipiente cerrable junto con nitrógeno gaseoso y almacenándolas a 15ºC o menos; o

(II) llenando las células en un recipiente cerrable junto con aire que tiene una concentración de oxígeno no mayor de 20%, y almacenándolas a 15ºC o menos.

La invención todavía proporciona además el uso de un compuesto que se ha aislado, extraído, purificado o refinado mediante el procedimiento anteriormente descrito, para producción de una composición alimentaria, alimento funcional, suplemento nutritivo, fórmula para lactantes prematuros, fórmula para lactantes a término, fórmula para niños lactantes, alimento pata niños lactantes, alimento materno, alimento geriátrico, composición cosmética y/o

farmacéutica. O, el compuesto que se ha aislado, extraído, purificado y/o refinado mediante el procedimiento anteriormente descrito, se puede usar para producción de un pienso para animales, pienso para peces y/o fertilizante para plantas.

Realizaciones para llevar a cabo la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para producción de micelios secos que contienen grasas y/o aceites que contienen AGPI y/o fosfolípidos que contienen AGPI, y/o a grasas y/o aceites que contienen AGPI y/o a fosfolípidos que contienen AGPI, mediante cultivo de un microorganismo capaz de producir compuestos que comprenden ácidos grasos poliinsaturados como ácidos grasos constituyentes (grasas y/o aceites que contienen AGPI y/o fosfolípidos que contienen AGPI).

Así pues, el cultivo de un microorganismo capaz de producir compuestos que comprenden ácidos grasos poliinsaturados como ácidos grasos constituyentes (grasas/aceites (triglicéridos) y/o fosfolípidos) es esencial. El microorganismo al que se hace referencia en este documento es preferiblemente un microorganismo que produce al menos un tipo de ácido graso poliinsaturado entre los siguientes: ácidos grasos poliinsaturados ω6 de C18 o superiores que tienen tres o más enlaces dobles, ácidos grasos poliinsaturados ω9 de C18 o superiores que tienen dos o más enlaces dobles, o ácidos grasos poliinsaturados ω3 de C18 o superiores que tienen tres o más enlaces dobles, como el ácido graso constituyente principal de los triglicéridos y/o fosfolípidos.

Como ácidos grasos poliinsaturados ω6 de C18 o superiores que tienen tres o más enlaces dobles se pueden mencionar ácido γ-linolénico (ácido 6, 9, 12-octadecatrienoico), ácido dihomo-γ-linolénico (ácido 8, 11, 14-eicosatrienoico), ácido araquidónico (ácido 5, 8, 11, 14-eicosatetraenoico), ácido 7, 10, 13, 16-docosatetraenoico, (22:4 ω6) y DPA ω6 (ácido 4, 7, 10, 13, 16-docosapentaenoico), como ácidos grasos poliinsaturados ω9 de C18 o superiores que tienen dos o más enlaces dobles se pueden mencionar ácido 6, 9-octadecadienoico, ácido 8, 11-eicosadienoico y ácido de Mead (ácido 5, 8, 11-eicosatrienoico), y como ácidos grasos poliinsaturados ω3 de C18 o superiores que tienen tres o más enlaces dobles se pueden mencionar ácido α-linolénico (ácido 9, 12, 15-octadecatrienoico), ácido 6, 9, 12, 15-octadecatetraenoico (18:4ω3), ácido 8, 11, 14, 17-eicosatetraenoico (20:4ω3), EPA (ácido 5, 8, 11, 14, 17-eicosapentaenoico), DPAω3 (ácido 7, 10, 13, 16, 19-docosapentaenoico), y DHA (ácido 4, 7, 10, 13, 16, 19-docosahexaenoico).

Por lo tanto, según la invención se puede usar cualquier microorganismo que pueda producir un compuesto que comprenda un ácido graso poliinsaturado como ácido graso constituyente (grasa/aceite (triglicérido) y/o fosfolípido). Como ejemplos de microorganismos capaces de producir aceites y/o grasas (triglicéridos) que contienen ácido araquidónico como ácido graso constituyente se pueden mencionar microorganismos que pertenecen a los géneros *Mortierella, Conidiobolus, Pythium, Phytophthora, Penicillium, Cladosporium, Mucor, Fusarium, Aspergillus, Rhodotorula, Entomophthora, Echinosporangium* y *Saprolegnia*.

Como ejemplos de microorganismos que pertenecen al género *Mortierella*, subgénero *Mortierella*, se pueden mencionar *Mortierella elongata, Mortierella exigua, Mortierella hygrophila* y *Mortierella alpina*. Más específicamente, se pueden mencionar las cepas de *Mortierella elongata* IFO8570, *Mortierella exigua* IFO8571, *Mortierella hygrophila* IFO5941, y *Mortierella alpina* IFO8568, ATCC16266, ATCC32221, ATCC42430, CBS219.35, CBS224.37, CBS250.53, CBS343.66, CBS527.72, CBS529.72, CBS608.70, CBS754.68, etc.

Como ejemplos de capaces de producir DHA se pueden mencionar los microorganismos que pertenecen al género *Crypthecodinium, Thrautochytrium, Schizochytrium, Ulkenia, Japonochytrium* y *Haliphthoros*.

Todas estas cepas se pueden adquirir sin restricción especial alguna del Institute for Fermentation, Osaka (IFO), American Type Culture Collection (ATCC) o Centralbureau voor Schimmelcultures (CBS). También se pueden usar las cepas de *Mortierella alpina* 1S-4 y *Mortierella elongata* SAM0219 (FERM BP-1239) (depositadas internacionalmente bajo las provisiones del Tratado de Budapest del 19 de marzo de 1986 con el International Patent Microorganism Depository of National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, de Chuo 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba city, Ibaraki pref., Japón) (FERM P-8703 depositada en Japón el 19 de marzo de 1986, se transfirió al depósito internacional), que se aislaron del suelo por el grupo de investigación para la presente invención.

Para el cultivo de una cepa que se haya de usar para la invención, se pueden sembrar células vegetativas, esporas y/o hifas de la cepa, una disolución de cultivo de semillas que se obtienen mediante precultivo de la cepa, o células vegetativas, esporas y/o hifas que se recogen del cultivo de semillas, en un medio líquido o un medio sólido para cultivo. La fuente de carbono usada puede ser una fuente común tal como glucosa, fructosa, xilosa, sacarosa, maltosa, almidón soluble, melaza, glicerol, manitol, o almidón sacarificado, aunque no hay limitación a estas.

Como fuentes naturales de nitrógeno se pueden usar fuentes naturales de nitrógeno tales como peptona, extracto de levadura, extracto de malta, extracto de carne, ácido casamino, líquido de molienda húmeda de maíz, proteína de haba de soja, haba de soja desgrasada y semilla de algodón comestible, así como fuentes de nitrógeno orgánico que incluyen urea o fuentes de nitrógeno inorgánico tales como nitrato de sodio, nitrato de amonio y sulfato de amonio, entre las cuales se pueden mencionar específicamente las fuentes de nitrógeno que se obtienen de haba de

soja, y particularmente haba de soja, haba de soja desgrasada, escamas de haba de soja, pulpa de soja, leche de soja, harina de soja y similares. Especialmente preferida para uso es el haba de soja desgrasada desnaturalizada por calor, y más preferiblemente uno o más tipos diferentes de haba de soja desgrasada tratada por calor a 70-90ºC aproximadamente y empobrecida en los componentes solubles en etanol, opcionalmente en combinación con cualquiera de las fuentes de nitrógeno anteriormente mencionadas.

Si es necesario, también se pueden añadir nutrientes en trazas que incluyen ión fosfato, ión potasio, ión sodio, ión magnesio o ión calcio, iones de metales tales como hierro, cobre, cinc, manganeso, níquel o cobalto, o vitaminas. Dichos componentes del medio no están restringidos particularmente siempre que estén en concentraciones que no interfieran con el crecimiento de los microorganismos. Para aplicaciones prácticas, la fuente de carbono se puede añadir a una concentración total de 0,1-40% en peso y preferiblemente 1-25% en peso y la fuente de nitrógeno a una concentración total de de 2-15% en peso y preferiblemente 2-10% en peso, y especialmente una adición inicial de fuente de carbono de 1-5% en peso y una adición inicial de fuente de nitrógeno de 3-8% en peso, con alimentación posterior de fuentes de carbono y de nitrógeno (más preferiblemente la fuente de carbono en solitario) durante el cultivo.

El rendimiento de la grasa o aceite que contiene AGPI se puede aumentar usando un precursor de ácido graso insaturado, por ejemplo, un hidrocarburo tal como hexadecano u octadecano; un ácido graso tal como ácido oleico o ácido linoleico o una de sus sales; un éster de ácido graso tal como un éster etílico, éster de ácido graso y glicerina o éster de ácido graso y sorbitán, o una grasa o aceite tal como aceite de oliva, aceite de haba de soja, aceite de semilla de colza, aceite de semilla de algodón o aceite de coco, tanto solos como en combinaciones. La adición del sustrato puede ser a 0,001-10% y preferiblemente 0,05-10% con respecto al medio. Dichos sustratos también se pueden usar como la única fuente de carbono para el cultivo.

La temperatura de cultivo para el microorganismo que produce la grasa o el aceite que contiene AGPI diferirá dependiendo del microorganismo que se use, y puede ser 5-40ºC y preferiblemente 20-30ºC, o las células que han crecido mediante cultivo a 20-30ºC se pueden cultivar posteriormente a 5-20ºC para producir grasas y aceites que contienen AGPI. Dicho control de temperatura también puede aumentar la proporción de AGPI de los ácidos grasos constituyentes en las grasas y/o aceites que contienen AGPI. El cultivo de la semilla también se puede llevar a cabo mediante cultivo en fermentador de vaso, cultivo con sacudida, cultivo en líquido estacionario o cultivo en sólido, y el cultivo en fermentador de vaso se lleva a cabo para el cultivo principal. El pH del medio al inicio del cultivo principal (tras la transferencia del cultivo de la semilla) se ajusta a 5-7, y preferiblemente a 5,5-6,5. El período de cultivo para cada etapa del cultivo de la semilla será normalmente de 1-10 días, preferiblemente de 1-5 días y más preferiblemente de 1-3 días. El período de cultivo para el cultivo principal será normalmente de 2-30 días, preferiblemente de 5-20 días y más preferiblemente de 5-15 días.

Se sabe que los microorganismos que pertenecen al género *Mortierella* subgénero *Mortierella* producen compuestos que comprenden ácido araquidónico como el principal ácido graso constituyente (grasas y/o aceites (triglicéridos que contienen ácido araquidónico) y/o fosfolípidos que contienen ácido araquidónico), pero a través de la mutagénesis de la cepa anteriormente mencionada, los inventores de la presente han tenido éxito en la obtención de un microorganismo capaz de producir grasas y aceites que comprenden ácido dihomo-γ-linolénico como principal ácido graso constituyente (publicación de patente japonesa pendiente de examen HEI Nº 5-91887), y microorganismos capaces de producir grasas y aceites que comprenden ácidos grasos poliinsaturados ω9 como los principales ácidos grasos constituyentes (publicación de patente japonesa pendiente de examen HEI Nº 5-91888, publicación de patente japonesa pendiente de examen HEI Nº 10-57085, publicación de patente japonesa pendiente de examen HEI Nº 5-91886).

Además, los autores de la presente invención han obtenido microorganismos que tienen resistencia a fuentes de carbono de alta concentración (WO98/39468), microorganismos que pertenecen al género *Mortierella* subgénero *Mortierella* y pueden producir células que contienen AGPI y/o grasas y aceites que contienen AGPI mediante el procedimiento de producción de la invención. Sin embargo, la presente invención no se limita a microorganismos que pertenecen al género *Mortierella* subgénero *Mortierella*, y el procedimiento de producción de la invención se puede aplicar a microorganismos capaces de producir compuestos que comprenden ácidos grasos poliinsaturados como ácidos grasos constituyentes (grasas y/o aceites (triglicéridos) y/o fosfolípidos), para obtener células secas que tienen en las células grasas y/o aceites que contienen AGPI y/o fosfolípidos que contienen AGPI, y para obtener aquellas grasas y aceites (aceites brutos y/o grasas y/o aceites refinados) y/o fosfolípidos (fosfolípidos brutos y/o fosfolípidos refinados).

El procedimiento para obtener el aceite bruto y/o el fosfolípido bruto de los microorganismos que tienen la grasa o el aceite acumulado en los micelios puede implicar el tratar la disolución enteramente cultivada directamente o después de esterilización, concentración y acidificación, y a continuación recuperar las células cultivadas mediante medios ordinarios de separación sólido/líquido tales como precipitación natural, separación centrífuga y/o filtración. Se puede ayudar a la separación sólido/líquido mediante adición de un agente de agregación o ayuda de filtración. Ejemplos de agentes de agregación incluyen cloruro de aluminio, cloruro de calcio, algina y quitosano. Se puede mencionar la tierra de diatomeas como ayuda de filtración.

A continuación, se secan los micelios cultivados recuperados. El secado puede evitar la putrefacción, la degradación

por oxidación y la hidrólisis durante el almacenamiento de los micelios. También puede aumentar la eficiencia de la extracción del aceite bruto de los micelios.

El procedimiento de secado se caracteriza porque comprende una combinación de secado primario mediante un sistema de calentamiento por conducción y secado secundario mediante un sistema de calentamiento por convección.

Para el secado con un sistema de calentamiento por conducción, empleando el secador de calentamiento por conducción como la principal fuente de calor, se usa un tipo de transportador de adhesión térmica. Un secador de tambor es más preferido. La temperatura de calentamiento sobre la superficie de conducción es de 100-200ºC, preferiblemente de 105-170ºC y más preferiblemente de 120-150ºC para calentamiento a sequedad. Cuando se usa un secador de tambor doble para el secado primario, las células secas primarias tienen una capa celular superficial similar a una hoja seca que resulta del calentamiento por conducción, y el raspado puede producir una forma en escamas de perfil no controlado. Más específicamente, las escamas tienen un grosor de 0,05-4 mm y preferiblemente 0,1-1 mm, con longitudes y anchuras (las longitudes de los lados de los cuadriláteros circunscritos) de 1-100 mm, preferiblemente 1-40 mm y más preferiblemente 2-20 mm. Las células secas primarias que tienen la capa superficial celular seca se pueden suministrar eficazmente para el posterior secado secundario con un sistema de calentamiento por convección.

La biomasa microbiana (que tiene una capa superficial celular seca) que se obtiene del secado primario con un sistema de calentamiento por conducción se suministra para el secado con un sistema de calentamiento por convección. El secado con el sistema de calentamiento por convección no está restringido particularmente siempre que el secador emplee calentamiento por convección como la principal fuente de calor, pero se prefiere usar un tipo de transporte de material, un tipo de agitación de material o un tipo de transporte de aire caliente, y más preferiblemente un tipo de transporte de material de banda aerobia o un tipo de agitación de material de lecho fluidizado o lecho fluidizado vibrante. La temperatura del aire caliente sobre la superficie de convección es 40-200ºC, preferiblemente 60-170ºC y más preferiblemente 80-150ºC como temperatura del aire caliente suministrado para el secado.

Dado que un secador del tipo de calentamiento por convección retira rápidamente la humedad evaporada de los alrededores de la materia prima mediante suministro de aire caliente, se considera que es un medio eficaz cuando se desea una reducción grande en el contenido en humedad. Sin embargo, por otra parte el gran suministro de aire caliente produce dispersión de polvo del material secado y eleva los costes de energía para los ventiladores soplantes, al tiempo que las materias primas con altos contenidos en humedad conducen a problemas tales como la formación de grumos debida a la adhesión entre los materiales, y a la disminución del área de contacto con el aire caliente.

Un secador del tipo de calentamiento por conducción puede conseguir eficiencia térmica alta con un flujo de aire prácticamente nulo, y por lo tanto los costes de energía de soplado y el escape de polvo de materia prima se pueden reducir enormemente. Por otra parte, sin embargo, y dado que el calentamiento se produce mediante conducción de calor en solitario ha sido difícil realizar el secado hasta un contenido bajo en humedad. Por lo tanto, se ha ingeniado novedosamente un sistema que utiliza las ventajas de ambos tipos, de modo que el secado se lleva a cabo mediante un sistema de calentamiento por conducción desde el período de pre-calentamiento hasta el período de velocidad de secado constante, un tiempo durante el que el contenido en humedad del material es mayor, y el secado se lleva a cabo mediante el sistema de calentamiento por convección desde el período de velocidad de secado constante hasta el período de caída de velocidad de secado, tiempo durante el cual el contenido en humedad es menor.

Por ejemplo, un procedimiento de secador de tambor doble, un tipo de sistema de calentamiento por conducción, permite que el contenido en humedad se reduzca drásticamente en el secado primario, al tiempo que el secado de la capa superficial celular impide la formación de grumos debida a la adhesión entre los materiales, y a la disminución del área de contacto con el aire caliente, durante el secado secundario. Además, dado que es posible minimizar el volumen de aire caliente y/o el tiempo de tratamiento del aire caliente en la etapa de secado con el sistema de calentamiento por convección, en comparación con los procedimientos convencionales que no emplean secado primario, se puede esperar una reducción en la dispersión y en los gastos de combustible, y por lo tanto este procedimiento es superior a los procedimientos convencionales.

Las máquinas que se usan para el secado celular según se reivindica no están restringidas particularmente, pero se pueden mencionar como ejemplos específicos los siguientes. Además, la presente invención no se limita a estas máquinas específicas, y se pueden usar otros aparatos cualesquiera que trabajen sobre los mismos principios de secado.

<u>Como máquinas de tipo de calentamiento por conducción se pueden mencionar las siguientes:</u>

Secador de mezclado cónico de husillo, Ookawara Mfg. Co., Ltd.

Secador de transferencia de calor por conducción, Ookawara Mfg. Co., Ltd.

Secador de tambor, Yamamoto Giken Koki Co., Ltd.

Secador de ciclón, Okadora Co., Ltd.

Como máquinas de tipo de calentamiento por convección se pueden mencionar las siguientes:

Secador de lecho fluidizado vibrante, Dalton Co., Ltd.

Secador de lecho fluidizado continuo horizontal, Dalton Co., Ltd.

Secador rotatorio, Dalton Co., Ltd.

Secador de flujo paralelo de tipo caja Dalton Co., Ltd.

Secador de flujo de aire de tipo caja Dalton Co., Ltd.

Secador/enfriador vibrante, Shinko Denki Co., Ltd.

Secador de lecho fluidizado, Ookawara Mfg. Co., Ltd.

Secador de flujo de aire de tipo banda, Ookawara Mfg. Co., Ltd.

Secador de banda, Daiwa Sanko Mfg. Co., Ltd.

Después de que se ha secado las células, se recuperan los aceites brutos que contienen AGPI y/o los fosfolípidos brutos que contienen AGPI. Los medios para recuperar el aceite bruto y/o los fosfolípidos brutos pueden ser un procedimiento de extracción con disolvente orgánico o un procedimiento de prensado, aunque se prefiere la extracción con disolvente orgánico en corriente de nitrógeno, Como disolventes orgánicos se pueden usar etanol, hexano, metanol, cloroformo, diclorometano, éter de petróleo, acetona y similares, o se puede emplear extracción alterna con metanol y éter de petróleo o un sistema de disolvente de capa única de cloroformo-metanol-agua. Sin embargo, el procedimiento de extracción que se usa para obtener el aceite bruto y/o los fosfolípidos brutos no se limita al procedimiento anteriormente descrito y puede ser una alternativa cualquier procedimiento que realice extracción eficaz de grasas y aceites (triglicéridos) y/o fosfolípidos celulares. Por ejemplo, se puede emplear extracción con flujo de CO_2 supercrítico como un medio eficaz.

Mediante retirada a presión reducida del disolvente orgánico o de los componentes supercríticos del flujo del extracto obtenido mediante extracción usando el disolvente orgánico o el flujo supercrítico, es posible obtener el aceite bruto y/o los fosfolípidos brutos diana.

Las células secas que contienen los compuestos que comprenden ácidos grasos poliinsaturados como ácidos grasos constituyentes (grasas y aceites que contienen AGPI y/o fosfolípidos que contienen AGPI) que se obtienen según la invención, o los aceites brutos (aceites brutos que contienen AGPI) y/o fosfolípidos brutos (fosfolípidos brutos que contienen AGPI), se pueden usar directamente mediante incorporación a piensos para animales. Sin embargo, para aplicaciones a alimentos, se usa preferiblemente un proceso de purificación común de grasa/aceite para obtener grasa/aceite que contiene AGPI refinado. El proceso de purificación de grasa/aceite que se usa puede ser un proceso ordinario tal como desengomado, desoxidación, desodorización, decoloración, tratamiento en columna, destilación molecular, hibernación o similares.

Hay un número ilimitado de usos para las biomasas microbianas, células secas que contienen grasas y aceites (triglicéridos) y/o fosfolípidos, aceites brutos, grasas y aceites (triglicéridos) refinados, fosfolípidos brutos y fosfolípidos refinados: por ejemplo, se pueden usar como materiales de partida y aditivos para alimentos, bebidas, cosméticos y preparados farmacéuticos. Los fines de uso y cantidades de uso tampoco están restringidos en absoluto.

Como ejemplos de composiciones alimentarias se pueden mencionar los alimentos ordinarios, así como los alimentos funcionales, suplementos nutritivos, fórmula para lactantes prematuros, fórmula para lactantes a término, fórmula para niños lactantes, alimentos infantiles, alimentos maternos o alimentos geriátricos. Como ejemplos de alimentos que contienen grasa/aceite se pueden mencionar los alimentos que contienen grasa/aceite naturales tales como carne, pescado y frutos secos, alimentos a los que se añaden grasas/aceites durante la preparación, tales como sopas, alimentos que emplean grasas/aceites como medios de calentamiento, tales como rosquillas, alimentos de grasa y aceite tales como mantequilla, alimentos procesados a los que se añaden grasas/aceites durante el procesado, tales como galletas, o alimentos sobre los que se pulverizan o se aplican como revestimiento grasas/aceites en su terminación, tales como bollería decorada. También se pueden añadir composiciones de este tipo a alimentos agrícolas, alimentos fermentados, piensos para el ganado, alimentos marinos y bebidas que no contienen grasas ni aceites. También pueden estar en forma de alimentos funcionales o preparados farmacéuticos y, por ejemplo, en forma procesada tales como nutrientes entéricos, polvos, gránulos, grageas en forma de rombo, disoluciones orales, suspensiones, emulsiones, jarabes y similares.

Ejemplos

La presente invención se explicará ahora con mayor detalle mediante los siguientes ejemplos, dándose a entender

que la invención no se limita a ellos.

Ejemplo de referencia 1. Enfriamiento en lecho fluidizado de células secas

Se transfirió una suspensión de esporas de *Mortierella alpina* 1S-4 al 1,0% en volumen a un medio que contenía 1,0% de extracto de levadura y 2,0% de glucosa a pH 6,3, y se comenzó el cultivo de semillas (primera etapa) en unas condiciones de 100 rpm de sacudidas alternantes, 28ºC de temperatura durante 3 días de cultivo.

A continuación, se prepararon 30 L de medio a pH 6,3 que contenía 1% de extracto de levadura, 2% de glucosa y 0,1% de aceite de haba de soja en un recipiente de cultivo de fermentador de vaso, y a continuación se transfirió el cultivo de semillas (primera etapa) al cultivo de semillas de comienzo (segunda etapa) en condiciones de 200 rpm de agitación, 28ºC de temperatura, 150 kPa de presión interna del recipiente, durante 2 días de cultivo.

A continuación, 4500 L de un medio (medio A: 336 kg de harina de haba de soja, 16,8 kg de KH_2PO_4, 2,8 kg de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 2,8 kg de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 5,6 kg de aceite de haba de soja) se ajustaron a pH 4,5 y se esterilizaron a 121ºC durante 20 minutos. Como un medio separado, 1000 L de medio (medio B: 112 kg de glucosa anhidra) se esterilizaron a 140ºC durante 40 minutos y se añadieron al medio A previo para preparar el medio C. Después de añadir hidróxido de sodio acuoso esterilizado al medio C para ajustar el pH a 6,1, se transfirió al mismo un volumen de 28 L del cultivo de semillas (segunda etapa) y se combinó con el total de 5600 L de la disolución de cultivo inicial (volumen del recipiente de cultivo de 10 kL). El cultivo se inició a una temperatura de 26ºC, con un caudal de aire de 49 Nm^3/hr y una presión interna de 200 kPa. Durante el cultivo, se alimentó el medio según el esquema que se muestra en la tabla a continuación durante un total de 306 horas de cultivo principal. Tras la terminación del cultivo, el volumen de la disolución de cultivo fue de 7730 L, como consecuencia del aumento debido a la alimentación al medio y al descenso debido a la evaporación.

momento del cultivo principal	alimentación al medio
hr 19ª	280 kg/460 L glucosa hidratada
hr 43ª	280 kg/450 L glucosa hidratada
hr 67ª	252 kg/390 L glucosa hidratada
hr 91ª	252 kg/410 L glucosa hidratada
hr 120ª	224 kg/370 L glucosa hidratada
hr 140ª	168 kg/280 L glucosa hidratada
hr 163ª	168 kg/270 L glucosa hidratada

Después de la terminación del cultivo y esterilización a 120ºC durante 20 minutos, se recuperaron las células húmedas usando un deshidratador continuo y se desintegraron, y a continuación se llevó a cabo el secado mediante secado por aire caliente (temperatura del aire caliente: 120ºC) con un secador de lecho fluidizado vibrante hasta un contenido en humedad de 1% en peso. Las células secas se enfriaron a 40ºC suministrando aire a temperatura ambiente al lecho fluidizado, y a continuación se usó un transportador de aire para llevar las células secas a la zona de llenado. Las células secas obtenidas se llenaron junto con nitrógeno gaseoso en una bolsa de recipiente en saco de aluminio que tenía un volumen de aproximadamente 1 m^3, y la boca de la bolsa se cerró por calor antes de almacenarla en un refrigerador por debajo de 10ºC.

Las células secas en la bolsa de recipiente se sometieron a extracción con hexano, y a continuación la disolución de hexano se filtró para retirar la porción sólida y se calentó a presión reducida para retirar el hexano, con el fin de obtener un aceite bruto que comprendía ácido araquidónico como ácido graso constituyente.

Ejemplo de referencia 2. Enfriamiento estático de células secas

Después del cultivo y esterilización mediante el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1, la recuperación y el secado de las células también se llevaron a cabo de la misma manera que en el Ejemplo 1. Las células secas se transfirieron a una tina plana y se extendieron uniformemente hasta un grosor de capa no mayor de 1 cm, para enfriamiento estático a temperatura ambiente. Tras enfriamiento a 50ºC, se llenaron junto con nitrógeno gaseoso en una bolsa de recipiente en saco de aluminio que tenía un volumen de aproximadamente 200 L, y la boca de la bolsa se cerró por calor antes de almacenarla en un refrigerador por debajo de 10ºC.

Ejemplo comparativo de referencia 1. Llenado de células secas sin enfriamiento

Después del cultivo y esterilización mediante el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1, la recuperación y el secado de las células también se llevaron a cabo de la misma manera que en el Ejemplo 1. Las células secas se

llenaron junto con nitrógeno gaseoso en una bolsa de recipiente en saco de aluminio que tenía un volumen de aproximadamente 200 L, y la boca de la bolsa se cerró por calor antes de almacenarla en un refrigerador por debajo de 10ºC.

Ejemplo de referencia 3. Análisis de células secas

Las bolsas de recipiente llenas que se prepararon en el Ejemplo 1, Ejemplo 2 y Ejemplo Comparativo 1 se abrieron una semana después del llenado, y se revisó el aspecto exterior de las células secas. A continuación, el aceite bruto se sometió a extracción mediante un procedimiento de extracción Soxhlet usando n-hexano como disolvente, para determinar el contenido en aceite. También se analizó el índice de peróxido (POV) del aceite bruto extraído mediante el procedimiento del Ejemplo 1.

Se confirmó con ello que cuando se lleva a cabo el llenado sin enfriamiento como en el Ejemplo Comparativo 1, las células y porciones de aceite experimentan una drástica reducción de calidad.

Tabla 1

	Células de Ejemplo 1	Células de Ejemplo 2	Células de Ejemplo Comparativo 1
Aspecto exterior de las células	Igual que en el momento del llenado (estado pulverizado marrón)	Igual que en el momento del llenado (estado pulverizado marrón)	Diferente que en el momento del llenado (masas marrón oscuro)
Contenido en aceite (% peso)	55%	53%	20%
Aspecto exterior del aceite bruto	amarillo	amarillo	marrón
POV del aceite bruto (meq/kg)	0,7 meq/kg	1,0 meq/kg	200 meq/kg

Ejemplo 1 Comparación entre el procedimiento de la técnica anterior de suministrar biomasa microbiana granulada para secado, y el procedimiento de la presente invención de secado de la masa microbiana mediante sistema de calentamiento por conducción y sistema de calentamiento por convección

Después de cultivar la cepa de *Mortierella alpina* 1S-4 que produce ácido araquidónico de la misma manera que en el Ejemplo 1, se suministró a un deshidratador continuo (SEKISUI CS-1 de Yanagawa Engineering) para filtración hasta que se obtuvo una masa de células húmedas. Se midió el contenido en humedad de las células húmedas mediante el procedimiento de pérdida en el secado (temperatura de 105ºC), lo que indicó un contenido en humedad del 52%. La masa de células húmedas se secó a continuación en las siguientes condiciones (Experimentos 4-1 a 4-2): El Experimento 4-1 empleó moldeo con granulación a temperatura ambiente, y por lo tanto no se vio cambio en el contenido en humedad de antes a después del moldeo. En el Experimento 4-2, el secado primario se realizó con un secador de tambor doble.

A continuación, las células granuladas y las células secas primarias se suministraron a un secador de lecho fluidizado para secado hasta un contenido en humedad de aproximadamente 2%. Las células secas se enfriaron mediante el procedimiento del Ejemplo 2, y a continuación se extrajo la porción de grasa/aceite y se determinaron el aspecto exterior y el índice de peróxido. Ambas tuvieron aspectos exteriores satisfactorios e índices POV de 10 meq/kg o inferiores, indicando con ello que se habían obtenido aceites brutos de partida que eran satisfactorios para producción de grasas/aceites refinados. El tiempo de secado y el rendimiento de secado fueron superiores en el Experimento 4-2 en el que el secado se llevó a cabo en dos etapas, en comparación con el Experimento 4-1 en el que el secado era en etapa única.

Tabla 2

	Experimento 4-1	Experimento 4-2
Máquina de procesado primario	Granulador de extracción	Secador de tambor doble
Temperatura de procesado primario	Temperatura ambiente (sin secado primario)	Secado primario a la temperatura de superficie del tambor de 140ºC
Forma del producto primario procesado	Granular Tamaño de gránulo: ~2-3 mm	Forma no controlada (escamas)
Contenido en humedad del producto moldeado	52%	21%

↓ Secado secundario con secador de lecho fluidizado (temperatura del aire caliente seco: 120ºC)		
Tiempo requerido para el secado	20 min	11 min
Contenido en humedad del producto seco	2,0%	1,9%
Rendimiento en seco *	92%	94%

* Rendimiento en seco (%) = volumen secado (como materia seca)/volumen que se carga de material de partida (como materia seca) x 100

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para aislar uno o más compuestos de una masa microbiana que contiene microorganismos que han producido dichos uno o más compuestos comprendiendo el procedimiento:

(a) preparar u obtener células húmedas que tienen un contenido en humedad promedio entre 30% y 80%;

(b) someter a las células húmedas a secado primario usando un sistema de calentamiento por conducción del tipo de transportador de adhesión térmica para obtener células secas primarias en forma de escamas y que tienen un contenido en humedad promedio entre 5% y 50%;

(c) someter a las células secas primarias que se han obtenido en (b) a secado secundario usando un sistema de calentamiento por convección para obtener células secas secundarias que tienen un contenido en humedad promedio no mayor de 10%; y

(d) extraer, aislar, purificar y/o refinar el compuesto o cada uno de los compuestos de las células secas.

2. Un procedimiento según la reivindicación 1 en el que la temperatura de calentamiento de la superficie de conducción del sistema de calentamiento por conducción es de 105 a 170ºC.

3. Un procedimiento según la reivindicación 2 en el que dicha temperatura de calentamiento es de 120 a 150ºC.

4. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que dicho sistema de calentamiento por conducción es un secador de mezclado cónico de husillo, un secador de transferencia de calor por conducción, un secador de tambor, un secador de tambor doble o un secador de ciclón de calentamiento por conducción.

5. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que dicho sistema de calentamiento por conducción de tipo transportador de adhesión térmica es un secador de tambor o un secador de tambor doble.

6. Un procedimiento según la reivindicación 5 en el que dicho sistema de calentamiento por conducción de tipo transportador de adhesión térmica es un secador de tambor doble y las células secas primarias tienen una capa superficial celular similar a una hoja seca.

7. Un procedimiento según la reivindicación 6 en el que dichas células secas primarias están en forma de escamas que tienen un grosor de 0,05 a 4 mm y longitudes y anchuras de 1 a 100 mm.

8. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde dicha biomasa contiene un hongo, se deriva de un hongo, contiene un alga o se deriva de un alga.

9. Un procedimiento según la reivindicación 8 en donde dicha biomasa contiene un hongo que pertenece al orden de *Mucorales*, por ejemplo *Mortierella*, o contiene un alga que pertenece al género *Chypthecodinium, Thraustochytrium, Schizochytrium, Ulkenia, Japonochytrium* o *Haliphthoros*.

10. Un procedimiento según la reivindicación 9 en donde dicha biomasa contiene *Mortierella alpina* o *Chypthecodinium cohnii*.

11. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho compuesto es triglicérido y/o fosfolípido que comprende un ácido graso poliinsaturado como ácido graso constituyente.

12. Un procedimiento según la reivindicación 11 en donde dicho ácido graso poliinsaturado es ácido α-linolénico (ácido 9, 12, 15-octadecatrienoico), ácido 6, 9, 12, 15-octadecatetraenoico (18:4ω3), ácido 8, 11, 14, 17-eicosatetraenoico (20:4ω3), EPA (ácido 5, 8, 11, 14, 17-eicosapentaenoico), DPAω3 (ácido 7, 10, 13, 16, 19-docosapentaenoico), DHA (ácido 4, 7, 10, 13, 16, 19-docosahexaenoico), ácido γ-linolénico (ácido 6, 9, 12-octadecatrienoico), ácido dihomo-γ-linolénico (ácido 8, 11, 14-eicosatrienoico), ácido araquidónico (ácido 5, 8, 11, 14-eicosatetraenoico), ácido 7, 10, 13, 16-docosatetraenoico, (22:4ω6), DPA ω6 (ácido 4, 7, 10, 13, 16-docosapentaenoico), ácido 6, 9-octadecadienoico (18:2 ω9), ácido 8, 11-eicosadienoico (20:2ω9) y/o ácido de Mead (ácido 5, 8, 11-eicosatrienoico).

13. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la etapa (c) usa un sistema de calentamiento por convección que se selecciona entre un secador de lecho fluidizado vibrante, un secador de lecho fluidizado continuo horizontal, un secador rotatorio, un secador de flujo paralelo de tipo caja, un secador de flujo de aire de tipo caja, un secador/enfriador vibrante, un secador de lecho fluidizado, un secador de flujo de aire de tipo banda o un secador de banda.

14. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 en el que en la etapa (c) la temperatura del aire caliente que se suministra sobre la superficie de convección para el secado es de 60 a 170ºC.

15. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde las células húmedas en (a) se

obtienen mediante separación sólido/líquido de una disolución de cultivo.

16. Un procedimiento según la reivindicación 11 o la 12 en el que se recupera de las células secas aceite bruto o fosfolípido bruto que contiene ácido graso poliinsaturado, mediante dicha extracción que es extracción con disolvente orgánico o extracción con flujo de CO_2 supercrítico.

17. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes al que sigue el uso de dicho compuesto que se ha aislado, extraído, purificado y/o refinado para producción de una composición alimentaria, alimento funcional, suplemento nutritivo, fórmula para lactantes prematuros, fórmula para lactantes a término, fórmula para niños lactantes, alimento para niños lactantes, alimento materno, alimento geriátrico, composición cosmética y/o farmacéutica.