

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 467 095**

51 Int. Cl.:

**A23K 1/14** (2006.01)

**A23K 1/16** (2006.01)

**A23D 9/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2005 E 05820568 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.03.2014 EP 1828361**

54 Título: **Procedimiento para producir un aceite crudo a partir de mezclas de microorganismos y plantas, aceite producido con dicho procedimiento y usos específicos del aceite producido con dicho procedimiento y, dado el caso, también refinado**

30 Prioridad:

**23.12.2004 DE 102004062141**

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

**11.06.2014**

73 Titular/es:

**LONZA LTD (100.0%)  
Münchensteinerstrasse 38  
4002 Basel , CH**

72 Inventor/es:

**FABRITIUS, DIRK**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 467 095 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**

5 Procedimiento para producir un aceite crudo a partir de mezclas de microorganismos y plantas, aceite producido con dicho procedimiento y usos específicos del aceite producido con dicho procedimiento y, dado el caso, también refinado

Procedimiento para producir un aceite crudo a partir de una mezcla de microorganismos y plantas.

10 La presente invención se refiere a un procedimiento para producir un aceite crudo a partir de una mezcla de microorganismos y plantas.

15 Los aceites que contienen ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga como el ácido araquidónico (ARA), ácido docosapentaenoico (DPA), ácido docosahexaenoico (DHA), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido estearidónico (SA) o ácido dihomoγ-linoléico (DHGLA) se pueden obtener del cultivo de microorganismos. Para ello, se cultiva normalmente un microorganismo que es rico en uno o más de los ácidos grasos mencionados, se recoge la biomasa del cultivo, se descompone y se aísla el aceite. Para aislar el aceite de la biomasa se ha usado hasta ahora principalmente un proceso de extracción con disolventes orgánicos, por ejemplo hexano, o fluidos supercríticos. En general, el aceite se extrae de la biomasa filtrando la biomasa seca con hexano. Este tipo de extracciones con disolventes orgánicos se describen con más detalle, por ejemplo, en WO97/37032, WO97/43362, EP515460, y muchos otros documentos. También se puede encontrar una exposición particularmente detallada en la revista Journal of Dispersion Science and Technology, 10, 561-579, 1989 "Biotechnological Processes for the Production of PUFAs".

25 Por lo general, es deseable alcanzar el mayor contenido posible de triglicéridos en el aceite final, sobre todo si se va a destinar para uso como producto alimentario o para fines farmacéuticos/cosméticos. Los fosfolípidos y ácidos grasos libres se consideran impurezas en el aceite final. Tampoco debe haber disolvente en el aceite final en cantidades significativas. Cuando se utiliza una biomasa con un alto contenido en fosfolípidos, se pueden extraer los fosfolípidos, en caso necesario, sin añadir más disolvente (por ejemplo, etanol) con ayuda de triglicéridos de origen natural que también actúan como disolvente. En particular, los fosfolípidos que contienen AGP (ácidos grasos poliinsaturados) son difíciles de aislar, caros, pero deseables para muchas aplicaciones.

35 Por lo tanto, la extracción de los AGP con disolventes proporciona una serie de desventajas básicas. Así, durante la extracción los AGP pueden reaccionar con disolventes calientes o en la destilación del disolvente con el oxígeno del aire, y formar con ello una oxidación no deseada en los productos de degradación de enlace doble específicos (degradación), lo cual es muy indeseable en la extracción. Para seguir eliminando totalmente el disolvente, se requiere, por lo general, un tratamiento térmico a una temperatura elevada, condiciones estas que son más propicias para la degradación. Siempre existe el riesgo de explosión con el uso de disolventes orgánicos, lo que hace necesario tomar medidas de seguridad costosas. Se sospecha que el hexano es una neurotoxina. Existen, por lo tanto, límites legales que hay que controlar, lo que aumenta aún más los costes. La eliminación de este tipo de residuos es asimismo cara.

40 Además, el disolvente, como el hexano, también puede disolver otros componentes de la biomasa que no sean triglicéridos, y por lo tanto formar impurezas que, o bien no se pueden separar más tarde, o sólo con gran esfuerzo.

45 El aceite crudo obtenido después de la eliminación del disolvente, por lo tanto, debe ser refinado aún más si se quiere usar el aceite como aceite alimentario y/o con fines farmacéuticos. Las etapas de refinado incluyen la eliminación de la goma (desgomado), la neutralización con soluciones alcalinas, la decoloración, el desparafinado y la desodorización para eliminar, al menos en parte, las impurezas. Sin embargo, esto significa que el aceite que contiene ácidos grasos altamente insaturados se somete a condiciones en las que es muy probable la aparición de reacciones fisicoquímicas en los ácidos grasos insaturados.

50 Sin embargo, también hay procedimientos para la extracción de la biomasa en los que no se utiliza un disolvente, véase, por ejemplo, EP-A-1178118. Según el procedimiento allí descrito, se evita un disolvente, se produce una suspensión acuosa de la biomasa y se separa la fase de aceite por centrifugación de la fase acuosa. La fase acuosa contiene los residuos de membranas celulares y una cierta cantidad de material soluble en agua procedentes de la biomasa. Un gran inconveniente de este procedimiento es el hecho de que el aceite crudo contiene varias impurezas, como lípidos polares, residuos de proteínas, etc. Por lo tanto, el aceite crudo obtenido de esta manera tiene que ser refinado a través de procedimientos tradicionales como los descritos anteriormente para los aceites vegetales y aceites microbianos.

60 En WO2004/022678 se describe un procedimiento para producir aceites microbianos que contienen AGP, en el que se obtiene un aceite que contiene AGP de una biomasa de microorganismos mediante prensado. La torta de prensado que queda se mezcla con un aceite que actúa como vehículo y se prensa de nuevo, con lo cual, el aceite que actúa como vehículo ayuda a disolver el resto de AGP de la torta de prensado, obteniéndose un segundo aceite de prensado que presenta una concentración de AGP más baja que el primer aceite de prensado. Mediante la mezcla de los dos aceites en proporciones variables en peso se pueden obtener concentraciones de AGP que se

adaptan a la aplicación particular deseada. En principio, aquí también se usa un segundo aceite como disolvente. Este procedimiento tiene, en principio, las mismas desventajas que se encuentran en la técnica anterior descrita anteriormente.

5 En general, el prensado de cierta biomasa, especialmente la proveniente de microorganismos como *Ulkenia sp.*, es difícil y a menudo requiere condiciones drásticas como altas presiones y temperaturas elevadas. Esto se hace en menoscabo del rendimiento y la calidad. Por otra parte, representa una considerable molestia por los malos olores, lo que también supone un peligro para el personal de la planta de producción.

10 Además, el propio aceite que actúa como vehículo puede oxidarse, lo cual disminuye la calidad. En el peor de los casos, el aceite que actúa como vehículo puede incendiarse espontáneamente por la oxidación (problema conocido cuando los AGP se almacenan al aire en superficies grandes durante mucho tiempo (por ejemplo, carbón activado, tierra esméctica)).

15 US 6 255 505 describe un aceite microbiano y productos derivados de este, que contienen al menos un AGP, con un contenido de triacilglicéridos de al menos el 93 %. El uso de una segunda biomasa no se menciona en este contexto.

20 WO 97/37032 también describe un procedimiento para producir un aceite microbiano y productos derivados de este. El uso de una segunda biomasa también se deduce de esta publicación.

25 WO 02/072742 A1 describe aceites y composiciones ricas en fosfolípidos para usar como productos alimentarios, medicamentos y cosméticos. Las composiciones contienen una mezcla de aceites microbianos y aceite de flor de girasol.

30 WO 92/12711 A1 describe aceites y composiciones ricas en fosfolípidos para usar como productos alimentarios, medicamentos y cosméticos. Las composiciones contienen una mezcla de aceites microbianos que contienen DHA y aceite de borraja o de onagra.

35 Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención evitar las desventajas de la técnica anterior, proporcionando un procedimiento para preparar un aceite estable, en el que el aceite comprenda uno o más ácidos grasos poliinsaturados, se obtenga de la biomasa y esté en forma de triglicéridos o fosfolípidos en un estado relativamente puro y presente un alto rendimiento, y en el que el aceite sólo sufra una degradación mínima.

40 Si se usa el aceite como un aceite alimentario es preferible una cantidad más alta de triglicéridos.

Estos y otros objetivos, que deducirá el experto en la materia de las desventajas explicadas de la técnica anterior, se alcanzan mediante un procedimiento con todas las características de la reivindicación 1.

45 Los modos de realización preferidos de la presente invención se describen y reivindican en las reivindicaciones dependientes y en las reivindicaciones independientes.

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir un aceite que contiene ácidos grasos poliinsaturados seleccionados del grupo que consiste en ARA, DPA, DHA, EPA, GLA, SA o DHGLA, en el que

- 45
- a) se cultivan microorganismos,
  - b) se recoge la biomasa de a),
  - c) se mezcla la biomasa obtenida con una segunda biomasa diferente de a), y
  - d) se obtiene el aceite mediante el prensado de la biomasa.

50 donde la segunda biomasa de la etapa c) es una semilla oleaginosa seleccionada del grupo que consiste en semilla de girasol, colza, borraja, onagra, lino, comino negro, soja, semilla de palma, palma, perilla, cártamo, germen de trigo, maíz, oliva, semilla de palma, sésamo.

55 Además, la presente invención se refiere a una torta de prensado obtenida de la etapa d) del procedimiento mencionado arriba.

Para los propósitos de la presente invención, por aceite también se entiende un lípido o una grasa.

60 El experto en la materia puede purificar los componentes individuales, como los triglicéridos o los fosfolípidos, del aceite crudo obtenido sin otras etapas conocidas del procedimiento, dependiendo de la aplicación deseada.

En un modo de realización preferido de la presente invención, la segunda biomasa está constituida por semillas de girasol.

65 No obstante, la segunda biomasa también puede ser una biomasa microbiana.

En otro aspecto preferido, la biomasa microbiana se seca antes de mezclar la segunda biomasa. En otro aspecto preferido, las biomazas microbianas proceden del cultivo de los siguientes organismos *Mortierella*, *Cryptocodinium* (dinoflagelado), *Thraustochytrium*, *Schizochytrium* (*Labyrinthulomycetes*), *Phaeodactylum*, *Nanochloropsis*, *Euglena*, *Tetrahymena*, *Spirulina*, así como preferiblemente *Ulkenia sp.*

Se ha encontrado que con el uso de semillas de girasol la operación de prensado se simplifica considerablemente. Esto es debido al hecho de que las semillas de girasol sirven como medios de fricción adicionales para facilitar la disgregación de la biomasa. Además, las propias semillas de girasol son ricas en aceite vegetal de alta calidad. Este se libera durante el proceso de prensado y sirve como lubricante para el molino, lo que facilita el prensado, y el aceite de girasol liberado también sirve como disolvente para los altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados que están presentes como triglicéridos en la biomasa microbiana.

Ventajosamente, los antioxidantes en la semilla/biomasa pueden influir en la estabilización adicional del producto. Por ejemplo, el *Cryptocodinium* forma así antioxidantes que pueden estabilizar mucho el aceite con DHA. De este modo, el procedimiento ofrece, de manera completamente sorprendente, una técnica simple para proporcionar aceites microbianos que son ricos en ácidos grasos poliinsaturados de manera económica y de excelente rendimiento.

Al mismo tiempo se puede obtener, ajustando la cantidad de semillas de girasol añadidas, un aceite que contiene diferentes concentraciones de AGP así como diferentes cantidades de contenido de aceite de girasol. Por lo tanto, se pueden desarrollar aceites de diseño específicamente adaptados a aplicaciones particulares.

También se puede utilizar, por ejemplo, el hongo *Mortierella* como segunda biomasa, que contiene altas cantidades de ARA (ácido araquidónico). Por ejemplo, con el uso de *Ulkenia* como primera biomasa se obtiene un aceite que contiene ARA y DHA. Además, se pueden variar las partes variando la parte relativa de la biomasa una con respecto a la otra. Como otra biomasa se usa semillas de girasol u otra planta oleaginosa; así los antioxidantes contenidos en los aceites vegetales influyen de forma favorable a la estabilidad de almacenamiento de los aceites que contienen ácidos grasos poliinsaturados.

Los aceites se obtienen, según la invención, de una o más biomazas microbianas, que se mezclan y/o muelen antes del prensado, idóneamente con frutos oleaginosos, preferiblemente semillas de girasol.

La producción de aceite se realiza con un prensado directo de la mezcla de biomazas. Si es necesario, este aceite obtenido es sometido a un refinado físico para conseguir el aceite deseado.

Para los propósitos de la presente invención, por refinado físico se entiende la reducción de los fosfolípidos y de los ácidos grasos libres, y comprende un tratamiento de desgomado sin usar ácidos y sin neutralización. Por lo tanto, mediante el uso de una biomasa que contiene ARA se ha observado que el aceite prácticamente no contenía ningún ácido graso ni fosfolípido, y por lo tanto, dependiendo del grado de pureza deseado, no era necesario un tratamiento de desgomado.

Sin embargo, si se utiliza una biomasa que contenía DHA, se hacía necesario un tratamiento de desgomado, concretamente para eliminar fosfolípidos.

Los aceites obtenidos son, por ejemplo, adecuados para su uso en productos alimentarios, en particular para la nutrición infantil, o para su uso como complementos nutricionales. No obstante, también pueden ser utilizados en productos cosméticos o farmacéuticos.

Sin embargo, la biomasa que queda después del prensado es un producto del proceso que, por ejemplo, encuentra uso como alimento para animales, en particular, para animales domésticos.

Resulta particularmente ventajoso que la segunda biomasa utilizada actúe como medio adicional para la disgregación de la biomasa microbiana. El prensado de la biomasa microbiana sola -que suele ser normalmente el caso- generalmente requiere exigencias muy altas en el proceso de prensado. Esta se prensa a presiones muy altas y muy a menudo a temperaturas elevadas, lo que a su vez es perjudicial para la calidad del aceite crudo resultante, en particular, con respecto a las posibles reacciones de oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados. Como segunda biomasa se utiliza semillas de girasol, de manera que las cáscaras de las semillas de girasol sirven como medio de fricción y disgregante y permite trabajar a presiones y temperaturas reducidas, lo que mejora considerablemente la calidad del aceite con AGP obtenido. Estos efectos se encuentran incluso con la adición de sólo pequeñas cantidades de la segunda biomasa.

Así, el aceite de semillas se usa como disolvente para los triglicéridos microbianos que contienen AGP, de manera que, en un modo de realización preferido, se puede prescindir, con el procedimiento según la invención, del uso de disolventes para disolver los triglicéridos.

Según la invención, se prefiere añadir particularmente semillas de girasol como segunda biomasa. Sin embargo, es posible, y así lo deducirá el experto en la materia por sí mismo, que también se pueden utilizar otras segundas biomásas. Sin embargo, la segunda biomasa es una biomasa vegetal, y en particular preferiblemente una biomasa en forma de frutos de plantas como aceitunas, nueces, hojas de plantas, cañas de plantas y tallos de plantas, así como legumbres, vainas y similares.

Son muy especialmente preferidos los frutos oleaginosos clásicos; se puede encontrar una lista de frutos oleaginosos clásicos en los libros de texto comunes de los trabajadores cualificados, por lo que no es necesario repetirla aquí. Como ya se ha indicado, se prefieren particularmente las semillas de girasol. El aceite obtenido según la invención tiene particularmente una carga baja de fosfolípidos, ácidos grasos libres, pigmentos, polímeros y otras sustancias, es decir, las sustancias de la biomasa no constituyen ningún triacilglicérido.

Por lo tanto, el procedimiento de la presente invención proporciona un proceso particularmente selectivo para la producción de un aceite estable, muy puro y que contiene AGP. En un aspecto particularmente preferido, por lo tanto, esta invención se refiere a un procedimiento que permite obtener, sin los procesos agresivos y laboriosos como el desgomado, la neutralización, el desparafinado y la decoloración, un aceite de alta calidad que contiene AGP.

No obstante, los aceites, siempre que sea apropiado, se someten a una etapa de refinado en el que se emplea un agente de procesado como, p. ej., un silicato. El tratamiento con el agente de procesado puede tener lugar, por ejemplo, durante la filtración. Por último, los aceites son, por ejemplo, sometidos a una desodorización por destilación con vapor o destilación molecular a una temperatura relativamente baja. Como consecuencia, el aceite resultante contiene una cantidad muy pequeña de ácidos grasos trans.

El procedimiento según la invención también incluye el uso asociado, después del prensado, de disolventes orgánicos para el procesado normal, como ocurre también en el procesamiento de aceites vegetales, como la winterización, el refinado, el blanqueo, la desodorización, etc. Estos procedimientos también son conocidos por el experto en la materia y no es necesario explicarlos aquí para los fines de la presente invención.

Dado que el procedimiento se lleva a cabo preferiblemente bajo una capa de nitrógeno y en presencia de tocoferoles o tocotrienoles, que se producen naturalmente en la segunda biomasa, o pueden añadirse durante el procedimiento, los AGP contenidos durante todo el proceso quedan protegidos de los efectos nocivos del oxígeno atmosférico.

La biomasa se puede utilizar ilimitadamente, dado el caso después de la eliminación del disolvente, como suplemento dietético, especialmente para la cría de animales.

Se ha descubierto que resulta particularmente beneficioso moler las dos biomásas antes de prensarlas juntas. Esto es particularmente importante cuando la segunda biomasa está formada por semillas oleaginosas que comprenden frutos relativamente grandes. En el uso preferido de semillas de girasol como segunda biomasa se descubrió que era particularmente favorable moler la biomasa hasta un grado en el que el tamaño de partícula resultante fuera inferior a 250 µm. En este supuesto, la molienda de una parte de los triglicéridos contenidos se libera ya en forma de aceite. Para la molienda, es por ejemplo posible utilizar un molino de bolas o un molino coloidal. Aquí son de particular importancia la duración de la molienda, el tamaño de las partículas de la biomasa, la temperatura durante la molienda, y la relación entre las dos biomásas. Está claro que, dado que la segunda biomasa utilizada en forma de semillas oleaginosas, especialmente semillas de girasol, presenta componentes duros, estos se alteran, por así decirlo, dañándolos durante la molienda de la biomasa, con lo que el aceite de la biomasa se libera parcialmente. Este es un efecto particularmente beneficioso que permite una disolución particularmente económica y, al mismo tiempo, una disolución con un rendimiento preliminar. Por lo tanto, esta etapa de molienda es también un modo de realización particularmente preferido de la presente invención. Se prefiere que las partículas resultantes de la segunda biomasa tengan un tamaño medio inferior a 500 µm, preferiblemente inferior a 300 µm y más preferiblemente inferior a 200 µm. Esta dimensión se refiere a, por lo menos, el 90 % de la biomasa inicialmente existente.

En este caso, el proceso de molienda continúa hasta que el 90 % de la biomasa utilizada tenga el tamaño de partícula deseado.

La temperatura durante la molienda se elegirá de manera que se encuentre por encima del punto de fusión del aceite que se obtiene normalmente de la segunda biomasa. Si, por ejemplo, la segunda biomasa es de semillas de girasol, se seleccionará una temperatura que esté por encima del punto de fusión del aceite de girasol. La temperatura es preferiblemente de 20-80 °C.

La relación en peso de la biomasa microbiana y la segunda biomasa se encuentra entre 100:1 a 1:100. Como se indicó anteriormente, la relación de las dos biomásas es importante para determinar la concentración de AGP en el aceite resultante. Aquí obviamente se prefieren aquellas relaciones en las que se consiga un contenido de AGP preferiblemente entre el 1 y el 10 % en el aceite diseñado final, ya que estas concentraciones son ventajosas en la mayoría de las aplicaciones farmacéuticas, cosméticas, alimentarias e industriales. Se obtiene, por ejemplo, una

biomasa en la que se puede conseguir aproximadamente el 40 % de AGP prensando la biomasa, pudiéndose elegir una relación preferida entre la segunda biomasa microbiana y la biomasa, en particular, los frutos oleaginosos, de tal manera que el aceite resultante comprenda aproximadamente el 10 % de AGP. Para ello debe tenerse en cuenta el rendimiento normal del aceite de la segunda biomasa, el cual, no obstante, conocerá el experto en la materia para las semillas oleaginosas convencionales en cualquier momento y sin ningún problema.

Puede ser necesario someter el aceite obtenido a una filtración fina, con el fin de eliminar las pequeñas partículas insolubles. Para ello, el experto en la materia conoce muchos procedimientos diferentes, por ejemplo, se puede exponer el aceite a un adsorbente inorgánico como coadyuvante de filtración, por ejemplo, filtración por tierra de diatomeas.

Finalmente, el aceite filtrado se libera de cimógenos, con lo cual se eliminan sustancias volátiles. Esto también puede llevarse a cabo utilizando el procedimiento conocido de la técnica anterior, aunque debe utilizarse en condiciones moderadas para no dañar los AGP. Por ejemplo, se puede utilizar la destilación al vapor, preferiblemente al vacío, o la destilación molecular.

El aceite obtenido de esta manera se puede utilizar, por ejemplo, en composiciones alimentarias para el consumo humano como tal o en forma de mezcla con otros aceites, como aceites para pescado o aceites para ensaladas, o alternativamente en forma de emulsión como aliño para ensalada o mayonesa. Puede ser un ingrediente de leche para la dieta de adolescentes o adultos, servir como fórmula infantil para bebés que no toman leche materna o como leche para niños pequeños. También se puede incorporar en una composición farmacéutica adecuada para la administración oral, enteral o parenteral, o para aplicaciones tópicas, dermatológicas u oftalmológicas. También puede ser un componente de una composición cosmética, tópica u oral. Por último, también se puede utilizar como alimento animal, por ejemplo, como alimento seco o húmedo o como leche. La biomasa restante puede usarse, ventajosamente, para la alimentación animal y para los fines antes mencionados.

Además, se puede usar, ventajosamente, una extracción de la biomasa restante, con un disolvente, preferiblemente un disolvente orgánico, y de forma particularmente preferida con un disolvente no polar inmiscible en agua, donde el hexano es particularmente preferido, para poder extraer la parte de aceite que no se liberó con el prensado. La extracción con hexano de esta biomasa se describe con detalle en la técnica anterior, donde se puede encontrar una descripción completa por ejemplo en EP 0 515 460 de Martek Corp.

En este ámbito existen, además de la extracción con hexano, una serie de otros procedimientos de extracción bien conocidos que son adecuados en este aspecto para obtener el aceite, preferiblemente con un alto contenido de triglicéridos, después del prensado de la torta de prensa restante, por ejemplo, la extracción con cloroformo/metanol o con CO<sub>2</sub> supercrítico.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento para producir un aceite que contiene ácidos grasos poliinsaturados seleccionados del grupo que consiste en ARA, DPA, DHA, EPA, GLA, SA o DHGLA, en el que
- 10 a) se cultivan microorganismos,  
 b) se recoge la biomasa de a),  
 c) se mezcla la biomasa obtenida con una segunda biomasa que es diferente de a), y  
 d) se obtiene el aceite mediante el prensado de la biomasa.
- 15 **caracterizado por que** la segunda biomasa de la etapa c) es una semilla oleaginosa seleccionada del grupo que consiste en girasol, colza, borraja, onagra, lino, comino negro, soja, semilla de palma, palma, perilla, cártamo, germen de trigo, maíz, oliva, semilla de palma, sésamo.
- 20 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que después de la etapa d) se somete la torta de prensado restante a una extracción con un disolvente para el aceite, preferiblemente un disolvente orgánico y más preferiblemente un disolvente no polar inmiscible en agua, prefiriéndose particularmente hexano, y se obtiene el aceite del disolvente tras la extracción.
- 25 3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el aceite obtenido de la etapa d) se mezcla con un aceite obtenido según el procedimiento de la reivindicación 2.
- 30 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** el procedimiento se lleva a cabo a una temperatura de al menos 5 °C, preferiblemente 10 °C por encima del punto de fusión del aceite con el punto de fusión más bajo obtenible de las dos biombras, en particular del aceite obtenible de la segunda biomasa, y más preferiblemente a una temperatura de entre 20 y 80 °C.
- 35 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que**, después de la etapa d), el aceite se refina con cuidado, sin disolvente y sin usar un medio básico o ácido realizando al menos una de las siguientes etapas:
- 40 a) procesamiento utilizando silicato, y/o  
 b) procesamiento utilizando filtración por tierra de diatomeas, y/o  
 c) desodorización con destilación al vapor.
- 45 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la primera biomasa comprende una biomasa procedente de uno de los siguientes microorganismos: *Mortierella*, *Cryptocodinium* (dinoflagelados), *Thraustochytrium*, *Schizochytrium* (*laberintulomicetos*), *Phaeodactylum*, *Nanochloropsis*, *Euglena*, *Tetrahymena*, *Spirulina*, *Chlorella* y *Ulkenia*, prefiriéndose *Ulkenia*.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** las dos biombras se muelen juntas antes de comenzar la operación de prensado.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, **caracterizado por que** la molienda se lleva a cabo a una temperatura de al menos 5 °C, preferiblemente 10 °C por encima del punto de fusión del aceite con el punto de fusión más bajo obtenible de las dos biombras, en particular del aceite obtenible de la segunda biomasa, y más preferiblemente a una temperatura de entre 20 y 80 °C.
9. Torta de prensado obtenida de la etapa d) de la reivindicación 1.