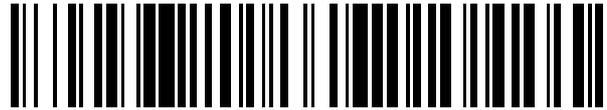


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 563 649**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/64** (2006.01)

**C11B 1/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2004 E 10174828 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.11.2015 EP 2251430**

54 Título: **Proceso de desaireación**

30 Prioridad:

**30.12.2003 EP 03258249**

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

**15.03.2016**

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)  
Het Overloon 1  
6411 TE Heerlen, NL**

72 Inventor/es:

**SCHAAP, ALBERT y  
VERKOEIJEN, DANIEL**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 563 649 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**

Proceso de desaireación

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a un proceso para producir un aceite o un ácido graso poliinsaturado (AGPI). El proceso implica desairear un líquido acuoso que comprende células de las cuales se obtiene (posteriormente) el aceite o el AGPI. Tras la desaireación, las células se pueden pasteurizar. Posteriormente, el aceite o el AGPI se puede extraer, purificar o aislar de las células.

**Fundamentos de la invención**

10 Los ácidos grasos poliinsaturados o AGPI, son de origen natural y una gran variedad de AGPI diferentes son producidos por diferentes organismos unicelulares (algas, hongos, etc). Un AGPI particularmente importante es el ácido araquidónico (ARA) que es uno de los numerosos 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.

15 El ácido araquidónico es un precursor principal de una gran variedad de compuestos biológicamente 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 cree que es esencial para un desarrollo neurológico infantil óptimo. El ácido araquidónico tiene un amplio número de aplicaciones diferentes entre ellas el uso en preparados para lactantes, productos alimentarios y piensos.

20 El documento WO-A-97/37032 se refiere a la preparación de un aceite que contiene AGPI microbiano a partir de biomasa pasteurizada. Sin embargo, no se menciona la desaireación antes de la pasteurización.

El documento WO-A-04/001021 publicado el 31 de diciembre de 2003 describe condiciones de pasteurización más detalladas.

25 El documento WO-A-03/092628 describe un método para preparar una composición lipídica con un deterioro oxidativo bajo, donde el método incluye un tratamiento enzimático.

30 Existe constancia de procesos que implican el calentamiento de biomasa o células microbianas. El documento WO-A- 97/37032 describe que se pueden pasteurizar células microbianas antes de extraer un AGPI de ellas en forma de un aceite. Sin embargo, los presentes solicitantes han descubierto que incluir un proceso de desaireación puede mejorar la calidad del aceite que se puede extraer de las células. En particular, el aceite resultante se puede oxidar menos o estar menos oxidado y puede tener un índice de peróxidos (IP) y/o un índice de anisidina (IAN) menores.

**Descripción de la invención**

Por lo tanto, la presente invención proporciona un proceso mejorado para producir un aceite o un ácido graso poliinsaturado (AGPI). La mejora es el uso de desaireación antes de la pasteurización.

35 Por lo tanto, la presente invención se refiere a un proceso para producir un aceite que comprende ácido araquidónico, comprendiendo el proceso:

a) desairear un líquido acuoso que comprende células microbianas que son *Mortierella alpina*, en el cual la desaireación elimina al menos parte del oxígeno disuelto y/o sin disolver; y

b) obtener el aceite de las células,

40 en el cual el líquido acuoso es un caldo de fermentación y en el cual las células se calientan o pasteurizan después de la desaireación de a) pero antes de la etapa b).

El líquido acuoso es un caldo de fermentación. Puede ser un líquido extraído o retirado durante la fermentación, aunque preferentemente es un caldo del final de la fermentación.

Las células microbianas pueden estar vivas antes, durante y/o después de la desaireación.

45 La desaireación del líquido acuoso da como resultado la eliminación del aire, tal como el aire encapsulado, atrapado, sin disolver y/o disuelto. Por lo tanto, el proceso puede ser o comprender a los efectos una desgasificación. Puede eliminar gas (p. ej., burbujas de gas).

El proceso eliminará oxígeno, tal como oxígeno disuelto (p. ej., en una forma encapsulada o como burbujas). En este contexto, "disuelto" se refiere a un gas, como el aire o el oxígeno, que está presente o disuelto en el líquido acuoso (en vez de a cualquier gas que se encuentre dentro de las células).

El proceso de desaireación también puede provocar la eliminación de otros gases del líquido acuoso, por ejemplo, dióxido de carbono.

5 La desaireación, al poder eliminar al menos parte del oxígeno disuelto y/o parte del oxígeno sin disolver, puede provocar una reducción de la oxidación. Esto puede significar que el AGPI y/o el aceite pueden estar menos oxidados y, por consiguiente, ser de mejor calidad.

10 No resulta evidente de inmediato que la eliminación del oxígeno pudiera ser ventajosa, ya que, por supuesto, las células microbianas requieren oxígeno para sobrevivir y crecer. De hecho, en muchos procesos de fermentación, incluidos los procesos preferidos de la invención, se suministra aire a las células microbianas, por ejemplo, se suministra (por ejemplo, se burbujea en su seno) al líquido acuoso o al medio de cultivo. Las células se dividirán y crecerán, y preferentemente al hacerlo también biosintetizarán uno o más AGPI. Por lo tanto, la idea de detener el suministro de oxígeno o aire durante el proceso de fermentación para efectuar la desaireación, no se pensaría necesariamente que fuera una estrategia conveniente ya que esto podría provocar la muerte de las células, o al menos puede que su capacidad para producir AGPI y otros compuestos valiosos se viera comprometida.

15 La desaireación se emplea en productos alimentarios, como la leche y el zumo de naranja, y también en algunos procesos industriales como en la fabricación de papel. Sin embargo, se debe notar que estos procesos pertenecen a un campo diferente al de la fermentación de organismos microbianos, en particular, para producir un compuesto que se va a extraer, y en esos sistemas (técnica anterior) no existen células (vivas). En algunos procesos de la técnica anterior, la desaireación se lleva a cabo para reducir el crecimiento bacteriano, mientras que en la presente invención, el crecimiento y la supervivencia de células microbianas (incluidas las células bacterianas), para producir  
20 AGPI, es un elemento importante del proceso de fermentación que requiere oxígeno.

Existen varias formas de llevar a cabo la desaireación, incluidas las siguientes:

- a) aplicación de vacío (o presión reducida);
- b) desaireación /desgasificación mecánica (agitación, vibración, empleo de fuerzas aceleratrices, p. ej., la fuerza de la gravedad, como en una centrifugadora o un ciclón);
- 25 c) cambios de viscosidad (por dilución con agua u otros líquidos, o por cambio de temperatura);
- d) cambio de las condiciones de fermentación, por ejemplo, una reducción de la ventilación, una reducción de la inyección de aire, o el suministro de oxígeno o aire durante la fermentación, o una reducción de la velocidad de agitación;
- 30 e) cambio de pH, por ejemplo, reduciendo el pH o acidificando (p. ej., empleando dióxido de carbono, que al disolverse en el líquido forma ácido carbónico);
- f) filtración, por ejemplo, empleando un filtro, capilar o membrana, tal como un polímero (preferentemente inerte), por ejemplo, PTFE;
- g) desplazamiento gaseoso, con un gas inerte como el nitrógeno o un gas noble como el helio;
- 35 h) desaireación química, por ejemplo, empleando un capturador de oxígeno, por ejemplo, sulfito sódico o hidrazina;
- i) tiempo, como para permitir que el líquido acuoso repose o en condiciones que permitan que un gas como el oxígeno o el aire se elimine por difusión del líquido; y/o
- j) una combinación de uno o más de los métodos anteriores.

Cada uno de los nueve métodos de desaireación se discutirán ahora en más detalle.

40 1. Vacío (o presión reducida)

Se puede aplicar el vacío por encima de la superficie del líquido acuoso. Sin embargo, puede que no se necesite siempre un vacío verdadero, sino que un método preferido implica una reducción de la presión por encima de la superficie del líquido acuoso, por ejemplo, mientras está dentro de un recipiente, como un recipiente de fermentación. Preferentemente, la presión por encima del líquido acuoso es menor que la presión atmosférica o ambiental, o al menos representa una reducción en la presión cuando se compara con la presión dentro del  
45 recipiente fermentador (o presión durante la fermentación). Por lo tanto, puede que haya una reducción de la presión cuando vaya a comenzar la desaireación, por ejemplo, una vez haya finalizado la fermentación.

El vacío o la presión reducida se puede aplicar en un recipiente separado del recipiente en el que se llevó a cabo la fermentación (como el fermentador). Así pues, el líquido se puede transferir a una estación de trabajo al vacío o un  
50 recipiente separado en el cual se aplica o puede estar presente un vacío. En este contexto, cuando se habla de la aplicación de un "vacío" como uno de los métodos de desaireación, se debe entender como la aplicación de presión

reducida al líquido acuoso. Esto se debe a que no es absolutamente esencial aplicar un vacío total.

Preferentemente, la presión aplicada (durante la etapa de desaireación por vacío) no es superior a 800, preferentemente no es superior a 600 y de forma óptima no es superior a 400 mbara (presión absoluta en milibares). En ciertas circunstancias, empleando el equipo adecuado, la presión no es preferentemente superior a 200 ó 100 mbara. Preferentemente, la presión reducida es de 50 a 600 mbara, tal como de 100 a 500 mbara, y de forma óptima de 200 a 450 mbara.

En una realización preferida, el líquido acuoso, por ejemplo, después de la fermentación, se transfiere a un recipiente con una presión reducida, es decir, una presión menor que la del fermentador (u otro recipiente del que se esté transfiriendo el líquido acuoso). La transferencia del líquido acuoso entre estos dos recipientes (como de un fermentador a un recipiente a presión reducida) puede ser facilitada o provocada por la diferencia de presión.

Por lo tanto, puede existir una presión de transferencia, que representa la presión a la que el líquido acuoso está sometido durante el movimiento de un recipiente al otro. Esta presión de transferencia preferentemente no es superior a 0.7, tal como 0.6, y preferentemente no es superior a 0.5 bar. La presión de transferencia puede ser de entre 0.7 y 0.3 bar, tal como de entre 0.6 y 0.4 bar.

El recipiente a presión reducida puede tener una forma de aumentar el área superficial del líquido acuoso, para facilitar la desaireación. Por lo tanto, el líquido acuoso puede tomar la forma de una película, como una película fina. El líquido acuoso puede ser sometido a presión para formar una película (tal como una película fina) por acción de un dispositivo mecánico, por ejemplo, una tobera, tal como una tobera de tipo paraguas, o un desaireador parasol. Así pues, el líquido acuoso se puede extender sobre una superficie curva mientras se aplica una presión reducida. Aumentar el área superficial del líquido acuoso, como en el caso en que se forme una película o una capa pulverizada, esto puede facilitar el proceso de desaireación, y puede dar como resultado un desgasificado más eficaz. El nivel del líquido acuoso dentro del recipiente de vacío reducido (que contendrá la tobera o superficie curva sobre la cual se extiende el líquido acuoso) puede ocupar de 1 a 2 décimas partes de este. El líquido acuoso recién desaireado se puede transferir posteriormente a un recipiente o una estación de trabajo para su pasteurización o calentamiento.

## 2. Desaireación mecánica

A menudo, durante la fermentación, se suministra oxígeno o (más frecuentemente) aire al líquido acuoso (medio de cultivo o caldo de fermentación). Esto es para permitir que las células microbianas crezcan, se dividan y biosintetizen AGPI.

Durante la fermentación, el líquido acuoso se puede agitar. Para desairearlo, la cantidad de agitación (o la velocidad de agitación) se puede reducir o ralentizar, o detener completamente. Es menos probable que la agitación reducida provoque la cavitación, tal como sobre o cerca de la pala de agitación o las superficies en movimiento, y es menos probable que forme burbujas (en el líquido acuoso).

Detener la agitación o reducir el grado de agitación, puede facilitar que las burbujas se fusionen en el líquido acuoso, y de esta forma asciendan a la superficie del líquido acuoso. Durante esta reducción de la agitación, la velocidad de agitación se puede reducir como máximo a la mitad, un tercio o incluso un cuarto de la velocidad de agitación durante la fermentación. Por ejemplo, si la velocidad de agitación es de 80 rpm, reducir la agitación, para facilitar la desaireación, puede requerir agitar a una velocidad que no sea superior a 40 rpm.

La desaireación mecánica también puede implicar la reducción de la cantidad de aire u oxígeno suministrado al líquido acuoso (caldo de fermentación, en términos de aireación). La velocidad de adición de oxígeno o aire se puede reducir o detener completamente. Durante la desaireación, la velocidad de suministro de aire (u oxígeno) se puede reducir como máximo a la mitad, un tercio o incluso un cuarto (como respecto de la velocidad durante la fermentación). Por lo tanto, la aeración del líquido puede detenerse o cesar antes del fin de la fermentación (p. ej., durante hasta 1, 2 ó 5 horas).

Habitualmente, se suministra aire (u oxígeno) al líquido acuoso durante la fermentación y mientras está dentro del recipiente de fermentación (o fermentador). Se deja que el gas burbujee en el líquido acuoso y esto puede ser por medio de un burbujeador. La desaireación puede implicar la reducción de la velocidad de suministro de aire u oxígeno mediante un burbujeador.

La desaireación también se puede conseguir por vibración, haciendo pasar el líquido acuoso a través de un recipiente de vibración (estático), tal como un tubo, o introduciéndolo en este.

El líquido acuoso se puede desairear empleando una bomba de desgasificación. El líquido acuoso se puede someter a fuerzas aceleratrices, por ejemplo, en un ciclón. Así pues, el líquido se puede someter a una fuerza centrífuga que puede facilitar la desaireación. El ciclón puede hacer rotar el líquido acuoso rápidamente y someterlo a la fuerza centrífuga en un recipiente, de forma que los gases que se desprendan del líquido puedan ascender y se puedan retirar o eliminar por la parte superior del ciclón, mientras que el líquido que se ha desaireado puede fluir en la dirección contraria (por ejemplo, hacia abajo).

5 Se puede emplear un desaireador de vacío mecánico para desairear el líquido acuoso. Este puede ser una bomba a la cual se puede aplicar un vacío (o presión reducida). Se comercializan bombas modificadas (p. ej., centrífugas) que pueden tolerar presión reducida o pueden generar un vacío. Preferentemente, la bomba de vacío tendrá una cámara rotatoria, en la cual se pueden eliminar las burbujas de gas del líquido acuoso, por ejemplo, por acción de la fuerza centrífuga.

10 Los tipos de equipo alternativos incluyen bombas de desgasificación. Estas pueden ser capaces de efectuar la desgasificación de líquidos con gases disueltos. La bomba puede poseer una bomba de vacío (p. ej., enclavada). Puede ser capaz de llevar a cabo la desgasificación sin aditivos químicos. Estos sistemas pueden ser capaces de desgasificar hasta un nivel menor o igual a 0.5 ppm. Pueden ser capaces de desarrollar una velocidad de flujo de 25 litros/minuto o menos. Se pueden adquirir bombas de desgasificación adecuadas de Yokota Manufacturing Company en Japón.

### 3. Ajuste de la viscosidad

Se puede conseguir un aumento de la viscosidad calentando el líquido acuoso. Este calentamiento también puede dar como resultado la desaireación.

15 Una reducción de la viscosidad puede facilitar que los gases del líquido acuoso suban a la superficie de forma más eficaz. Por consiguiente, los métodos de reducción de la viscosidad pueden facilitar el proceso de desaireación. Esto se puede conseguir agregando otro líquido (desaireado de por sí o con un contenido de aire/oxígeno menor que el líquido acuoso), como agua, y por lo tanto el proceso puede comprender diluir. El líquido acuoso suele ser bastante viscoso debido a la presencia de células y fuentes de nitrógeno y/o carbono que serán asimiladas por las células.

20 Otro método de reducción de la viscosidad es calentando el líquido acuoso. Un aumento en la temperatura disminuye la solubilidad del oxígeno en el líquido.

### 4. Ajuste del pH

El líquido acuoso se puede acidificar. Esto puede reducir la solubilidad del aire/oxígeno que contiene.

25 Se sobreentenderá que el líquido acuoso comprende células vivas que pueden sintetizar compuestos valiosos. Las células "respiran" en tanto que consumen oxígeno y liberan dióxido de carbono. El dióxido de carbono puede disolverse en el líquido acuoso y al hacerlo produce ácido carbónico. Al reducir el pH, esto puede hacer que el líquido acuoso sea más ácido, y reducir de esta forma la solubilidad del dióxido de carbono (u oxígeno) en él.

### 5. Filtración

30 El líquido acuoso se puede hacer pasar a través de un filtro o una membrana que puede ser capaz de eliminar burbujas pequeñas, como las de aire. Esto se puede llevar a cabo en una escala relativamente pequeña. Un filtro o una membrana comprende preferentemente un material inerte, como un polímero. El material (p. ej., polímero) puede comprender un alquileno halogenado, como PTFE.

35 El líquido acuoso puede hacerse, por lo tanto, pasar a través de un tubo o capilar (p. ej., uno pequeño o relativamente fino). Este puede comprender (p. ej., en una pared) o poseer (un recubrimiento de) un polímero, como el PTFE. El tubo puede presentar agujeros o aberturas a través de las cuales pueden pasar los gases disueltos o las burbujas. El líquido acuoso puede hacerse pasar a través de estos tubos o capilares a presión.

### 6. Desplazamiento gaseoso

40 Esto implica desplazar o sustituir el oxígeno o aire (disuelto o no) del líquido acuoso. El aire u oxígeno puede ser sustituido por una gran variedad de gases, siempre que, preferentemente, el oxígeno disuelto se libere de la solución y pueda entonces eliminarse del líquido acuoso. Se prefiere un gas inerte, por ejemplo, nitrógeno o un gas noble, como el helio. El gas se puede suministrar por encima o sobre el líquido acuoso (como en el espacio libre del fermentador). Por ejemplo, se puede agregar o suministrar en el espacio libre encima del líquido, por ejemplo, en un recipiente como un fermentador. Como alternativa, el gas se puede suministrar al líquido acuoso, por ejemplo, burbujeándolo o empleando el burbujeador. El gas preferido es nitrógeno, aunque se puede emplear un gas que comprenda nitrógeno (pero con una cantidad reducida de oxígeno, como inferior a un 20% o inferior a un 10% o 15%, de modo que sea menor que los niveles atmosféricos).

50 La técnica preferida es reducir o detener la cantidad de aire (u oxígeno) suministrada al líquido acuoso antes de que termine la fermentación. Primero, por ejemplo, no se puede suministrar aire, p. ej., a través de un burbujeador, durante al menos una o dos horas antes del final de la fermentación. En vez de suministrar aire a través del burbujeador, se puede suministrar otro gas que no sea aire ni oxígeno, por ejemplo, uno con un contenido reducido de oxígeno, por ejemplo, nitrógeno. Así pues, preferentemente, se puede suministrar nitrógeno al líquido acuoso hasta una o dos horas antes del final de la fermentación. Esto puede crear una atmósfera con un contenido reducido de oxígeno o inerte (p. ej., rica en nitrógeno) por encima del líquido acuoso, por ejemplo, una atmósfera que tiene un contenido de nitrógeno más alto que el aire atmosférico. La presión del nitrógeno encima del líquido acuoso puede

ser de entre 0.4 y 0.8 bar, tal como de aproximadamente 0.6 bar.

7. Desaireación química

5 La desaireación química se puede conseguir empleando una sustancia o producto químico que pueda reaccionar de forma conveniente con el aire, o de forma aún más importante con el oxígeno del aire. La sustancia puede ser un  
 5 captador de oxígeno. La sustancia se puede poner en contacto con el líquido acuoso. El producto químico se puede agregar al líquido acuoso, por ejemplo, mientras esté en un recipiente, tal como un recipiente fermentador. Los materiales que reaccionan con oxígeno adecuados, incluidos los capturadores de oxígeno, son de uso común en la materia e incluyen sulfito de un metal alcalino (como el sodio) y compuestos que comprenden hidrazina. Se pueden emplear otros métodos de desaireación (no químicos) si el AGPI o el aceite se van a emplear en un  
 10 producto alimentario.

8. Tiempo

Si se deja reposar, el líquido acuoso desprenderá lentamente los gases disueltos que contenga, como el oxígeno y el aire. Los gases disueltos pueden difundirse del líquido acuoso. De forma que, con el tiempo, se liberen de la solución.

15 Medida del contenido de aire/oxígeno

Esto se puede llevar a cabo empleando técnicas estándares en la materia. Por ejemplo, se puede emplear un detector de gas retenido (EGT, por sus siglas en inglés). La cantidad de aire se puede medir mediante técnicas en línea en el líquido acuoso (a los efectos, una suspensión microbiana de las células).

20 El gas retenido (burbujas de gas) se puede medir comprimiendo una muestra en una célula de medida. La fracción volumétrica del gas retenido se calcula posteriormente aplicando la Ley de Boyle ( $pV=\text{constante}$ ). Por otra parte, el gas disuelto que se puede liberar se puede medir expandiendo la muestra. Esto simula una bajada marcada de la presión. Al reducir la presión en la célula de medida, la solubilidad de los gases decrece y se liberan. De esta forma, el volumen de la suspensión aumenta. La operación puede ser completamente automática y/o puede comprender un analizador de gases en línea, en un sitio adecuado del sistema, convenientemente después de la desaireación.

25 La desaireación puede dar como resultado un contenido de O<sub>2</sub> (en el líquido acuoso) inferior a 20 o 15 ppm, por ejemplo, de 2 ó 5 a 15 ó 20 ppm. La concentración del oxígeno (p. ej., disuelto) puede ser preferentemente menor de 10, tal como menor de 5 y de forma óptima menor de 2 ppm.

Preferentemente, la desaireación tiene lugar de forma que la concentración de oxígeno (disuelto) sea menor de 0.03 cc/litro (44 ppb), preferentemente menor de 0.005 cc/litro (7ppb).

30 El líquido acuoso desaireado (obtenido desaireando el líquido acuoso que comprende las células de acuerdo con la invención) se puede someter convenientemente a una presión mayor y/o una temperatura mayor. La presión mayor y/o la temperatura mayor pueden, por ejemplo, estar presentes durante el calentamiento y/o la pasteurización de las células.

35 En una realización preferida, el proceso de acuerdo con la invención comprende someter el líquido acuoso desaireado a una presión de al menos 1 bara, preferentemente de al menos 1.5 bara, preferentemente de al menos 2 bara, preferentemente de al menos 5 bara. No existe un límite máximo específico para la presión. El líquido acuoso desaireado puede, por ejemplo, someterse a una presión menor de 40 bara, por ejemplo, menor de 20 bara.

40 En una realización preferida, el proceso de acuerdo con la invención comprende someter el líquido acuoso desaireado a una temperatura de al menos 60 °C, preferentemente de al menos 80 °C, preferentemente de al menos 90 °C, preferentemente de al menos 100 °C, preferentemente al menos 110 °C. No existe un límite máximo específico para la temperatura. El líquido acuoso desaireado puede, por ejemplo, someterse a una temperatura menor de 150 °C.

Preferentemente, el líquido acuoso desaireado que se puede someter a la temperatura mayor y/o la presión mayor posee el contenido y/o la concentración de O<sub>2</sub> (disuelto) como la que se divulga en la presente.

45 Proceso de pasteurización

La pasteurización normalmente tendrá lugar una vez que la desaireación y/o fermentación hayan terminado. En una realización preferida, la pasteurización detendrá la fermentación, porque el calor durante la pasteurización matará a las células. Por lo tanto, la pasteurización se puede realizar sobre el caldo de fermentación (o las células en el medio líquido (acuoso)), aunque se puede realizar sobre la biomasa microbiana obtenida del caldo. En este  
 50 último caso, la pasteurización se puede realizar mientras las células microbianas están aún dentro del fermentador. La pasteurización preferentemente se realiza antes de cualquier otro procesado de las células microbianas, por ejemplo, granulación (p. ej., por extrusión), disgregación o amasado.

Una vez terminada la fermentación, el caldo de fermentación se puede filtrar o, de otro modo, tratar para eliminar el

agua o el líquido acuoso. Tras eliminar el agua, se puede obtener una "pasta" biomásica. Si la pasteurización no ha tenido lugar, entonces las células deshidratadas (o pasta biomásica) se puede someter a pasteurización.

5 La pasteurización se puede realizar calentando (las células) directamente o indirectamente. El calentamiento, si es directo, puede ser introduciendo vapor en el fermentador. Un método indirecto puede emplear un medio con intercambiadores de calor, a través de la pared del fermentador o con serpentines de calentamiento, o un intercambiador de calor externo como un intercambiador de calor de placas.

10 Normalmente, la pasteurización tendrá lugar en el recipiente fermentador en el cual tiene lugar la fermentación. Sin embargo, para algunos organismos (como bacterias) se suele preferir eliminar las células del recipiente primero y después pasteurizar. La pasteurización puede tener lugar antes de otro procesado de los organismos, por ejemplo, secar o granular.

La pasteurización normalmente matará a la mayoría o sino a todos los microorganismos. Tras la pasteurización, se pueden haber muerto al menos un 95%, 96% o incluso un 98% de los microorganismos, es decir, no están vivos.

15 El calentamiento o la pasteurización de las células se puede llevar a cabo a cualquier temperatura adecuada, preferentemente a una temperatura de al menos 60 °C, preferentemente de al menos 80 °C, preferentemente de al menos 90 °C, preferentemente de al menos 100 °C, preferentemente de al menos 110 °C. No existe un límite máximo específico para la temperatura. La pasteurización puede, por ejemplo, realizarse a una temperatura menor de 150 °C. Los procesos de pasteurización preferidos se describen en WO 97/37032 y WO-A-04/001021.

#### *Extracción de un AGPI*

20 La presente invención puede implicar extraer y/o aislar un AGPI de las células (p. ej., pasteurizadas). Preferentemente, esto tiene lugar después de la desaireación y (opcionalmente) también después de la pasteurización.

La extracción puede empezar primero con la adición de un haluro de un metal alcalinotérreo, como cloruro de calcio. Las células se pueden someter (posteriormente) a filtración, lavado y/o compresión, para generar una pasta húmeda.

25 Las células microbianas se pueden someter posteriormente a extrusión y, en caso necesario, el extrusado o los gránulos extrusados resultantes se someten a secado. Los gránulos secos resultantes o la biomasa seca se pueden emplear posteriormente para extraer uno de los AGPI, preferentemente un aceite que contiene uno o más AGPI. Los procesos de extracción preferidos para preparar un aceite que contiene un AGPI a partir de células microbianas se describen en las Solicitudes de Patente Internacional N.<sup>os</sup> PCT/EP99/01446 (WO 97/36996), PCT/EP97/01448 (WO 97/37032) y PCT/EP01/08903 (WO 02/10423).

#### *Ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) y aceites microbianos*

35 El AGPI puede ser un único AGPI o dos o más AGPI diferentes. El AGPI o cada uno de ellos puede ser de la familia n-3 o n-6. Preferentemente, es un AGPI C<sub>18</sub>, C<sub>20</sub> o C<sub>22</sub>. Puede ser un AGPI con al menos 18 átomos de carbono y/o al menos 3 ó 4 dobles enlaces. El AGPI se puede presentar 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.

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

ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6 Ω 3), convenientemente de algas u hongos, como el (dinoflagelado) *Cryptothecodinium* o el (hongo) *Thraustochytrium*;

ácido γ-linolénico (GLA, 18:3 Ω 6);

40 ácido α-linolénico (ALA, 18:3 Ω 3);

ácido linoleico conjugado (ácido octadecadienoico, CLA);

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

ácido araquidónico (ARA, 20:4 Ω 6); y

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

45 Los AGPI preferidos incluyen ácido araquidónico (ARA), ácido docosahexaenoico (DHA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y/o ácido γ-linolénico (GLA). En particular, se prefiere el ARA.

50 El AGPI puede ser producido por las células pasteurizadas en el proceso descrito en la presente, tales como una célula microbiana. Esta puede ser una célula de bacteria, alga, hongo o levadura. Se prefieren los hongos, preferentemente del orden *Mucorales*, por ejemplo, *Mortierella*, *Phycomyces*, *Blakeslea*, *Aspergillus*, *Thraustochytrium*, *Pythium* o *Entomophthora*.

5 En el proceso de la invención, el AGPI es ARA y la fuente de ARA es la *Mortierella alpina*. Otras fuentes de ARA son *Blakeslea trispora*, *Aspergillus terreus* o *Pythium insidiosum*. Las algas pueden ser dinoflageladas y/o pueden incluir *Porphyridium*, *Nitzschia* o *Cryptocodinium* (p. ej., *Cryptocodinium 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).

10 Se prefiere que la mayor parte del AGPI esté en forma de triglicéridos. Así pues, preferentemente al menos un 50%, por ejemplo al menos un 60%, u de forma óptima al menos un 70% del AGPI está en forma de triglicéridos. Sin embargo, la cantidad de triglicéridos puede ser mayor, como al menos un 85%, preferentemente al menos un 90%, de forma óptima al menos un 93% o 95% del aceite. De estos triglicéridos, preferentemente al menos un 40%, como al menos un 50% y de forma óptima al menos un 60% del AGPI está presente en la posición a del glicerol (presente en el esqueleto triglicérido) y también hay constancia de la posición 1 ó 3. Se prefiere que al menos un 20%, como al menos un 30%, de forma óptima al menos un 40% del AGPI esté en la posición b(2).

15 El aceite microbiano puede comprender al menos un 10, 35, 40 ó 45%, o más de un AGPI deseado, como el ácido araquidónico. Puede tener un contenido de triglicéridos de al menos un 90%, como de 92-94%. Normalmente, el aceite microbiano tendrá un contenido de ácido eicosapentaenoico (EPA) inferior a un 5%, preferentemente inferior a un 1% y más preferentemente inferior a un 0.5%. El aceite puede tener menos de un 5%, menos de un 2%, menos de un 1% de cada uno de los ácidos grasos C<sub>20</sub>, C<sub>20:3</sub>, C<sub>22:0</sub> y/o C<sub>24:0</sub>. El contenido de ácidos grasos libres (AGL) no debe ser superior a 1.0, 0.4, 0.2 ó 0.1. El aceite puede tener poco o nada de GLA y/o DGLA.

20 El aceite microbiano puede ser un aceite crudo. Puede haber sido extraído de las células empleando un solvente, por ejemplo, un líquido orgánico como hexano o isopropanol.

#### Proceso de extracción de AGPI

25 El AGPI (o aceite microbiano, que normalmente comprende el AGPI) puede ser extraído de las células microbianas (pasteurizadas). Preferentemente, se extrae de gránulos (p. ej., secos), p. ej., extrusados, que contienen las células. La extracción se puede llevar a cabo empleando un solvente. Preferentemente, se emplea un solvente apolar, por ejemplo, un alcano C<sub>1-6</sub>, preferentemente C<sub>2-6</sub>, por ejemplo, hexano.

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

30 El solvente permite obtener un aceite que contiene AGPI crudo. Este aceite se puede emplear en esa etapa, sin procesarlo más, o se puede someter a uno o más pasos de refino. Sin embargo, un aceite crudo suele ser aquel que contiene un solvente, tal como un solvente empleado para extraer el aceite (p. ej., hexano, o un alcohol como el alcohol isopropílico) o que no ha sido sometido a uno (o preferentemente a ninguno) de los siguientes pasos de refino. Los protocolos de refino adecuados se describen en la Solicitud de Patente Internacional WO 02/10322.

35 Por ejemplo, el aceite se puede someter a uno o más pasos de refino que pueden incluir: tratamiento ácido o desengomado, tratamiento alcalino o eliminación de ácidos grasos libres, decoloración o eliminación de pigmentos, filtración, invernación (o enfriamiento, por ejemplo, para eliminar los triglicéridos saturados), desodorización (o eliminación de ácidos grasos libres) y/o depuración (o eliminación de sustancias insolubles en aceite). Todos estos pasos de refino se describen más detalladamente en WO 02/10322 y se pueden aplicar a los pasos descritos en la presente solicitud *mutatis mutandis*.

40 El aceite resultante es particularmente adecuado para usos nutricionales, y se puede agregar a alimentos (humanos) o piensos (animales). Los ejemplos incluyen leche, preparados para lactantes, bebidas saludables, pan y piensos.

#### Células

45 Las células pueden ser cualesquiera células de las cuales se puede obtener un aceite o un AGPI. Preferentemente, las células son células microbianas. Las células microbianas (o microorganismos) empleadas en la presente invención pueden ser cualesquiera de las descritas previamente, especialmente en la sección que se refiere a AGPI y aceites microbianos. Pueden comprender, o ser capaces de producir, un AGPI o aceite microbiano, y de forma conveniente el aceite de AGPI se puede extraer o aislar de las células. Pueden estar en forma filamentosa, como hongos o bacterias, o unicelular, como levaduras, algas o bacterias. Las células pueden comprender microorganismos que sean levaduras, hongos, bacterias o algas. Los hongos preferidos son del orden *Mucorales*, por ejemplo, el hongo puede ser del género *Mortierella*, *Phycomyces*, *Blakeslea* o *Aspergillus*. Se prefieren los hongos de las especies *Mortierella alpina*, *Blakeslea trispora* y *Aspergillus terreus*.

En lo referente a levaduras, estas son preferentemente del género *Pichia* (como de la especie *Pichia ciferrii*) o *Saccharomyces*.

55 Las bacterias pueden ser del género *Propionibacterium*.

## ES 2 563 649 T3

Si las células son de un alga, esta será preferentemente una dinoflagelada y/o pertenecerá al género *Cryptothecodinium* o *Daniella*. Las algas preferidas son de la especie *Cryptothecodinium cohnii* o *Daniella salina*.

### *Índice de peróxidos (IP)*

- 5 Preferentemente el IP del aceite (microbiano) es de 3 a 8 ó 12. Sin embargo, se pueden obtener valores de IP menores empleando el proceso de la invención, y estos valores pueden ser menores de 10.0 o menores de 8.0. El IP se puede medir empleando técnicas de uso común en la materia, por ejemplo, de acuerdo con AOCS Cd-8-53. La unidad (para IP) suele ser meq/kg.

### *Índice de anisidina (IAN)*

- 10 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. De forma conveniente, el IAN no es superior a 20, por ejemplo, no es superior a 15. Puede que no supere 10 o que incluso no supere 5 ó 2. Los valores de IAN (en los experimentos preferidos) varían de 5 a 15, de forma óptima de 7 a 12. Preferentemente, el IAN es de 2 ó 5 a 12 ó 15. El IAN se puede medir empleando técnicas de uso común en la materia, por ejemplo, de acuerdo con AOCS Cd-18-90.

### *Usos de aceites y AGPI*

- 15 Se presenta también una composición que comprende el aceite y, según proceda, o más sustancias (adicionales). La composición puede ser un alimento y/o un suplemento alimentario para animales o humanos. Los aceites pueden ser modificados para que sean adecuados para el consumo humano, en caso necesario, normalmente por refinado o purificación del aceite obtenido de los microbios.

- 20 La composición puede ser un preparado para lactantes o un alimento (humano). Así pues, la composición del preparado se puede ajustar para que contenga una cantidad de lípidos similar o AGPI similar a la leche materna normal. Esto puede implicar mezclar el aceite microbiano obtenido mediante el método de la invención con otros aceites para obtener la composición adecuada.

La composición puede ser una composición o un suplemento de un pienso animal o marino.

- 25 Dichos piensos y suplementos se pueden administrar a animales de granja, en particular ovejas, ganado y aves de corral. Además, los piensos o suplementos se pueden administrar a organismos marinos de granja como peces y moluscos. La composición puede incluir de este modo una o más sustancias o ingredientes alimentarios para un animal de este tipo.

- 30 El aceite obtenido mediante el método de la invención puede ser un aceite crudo o refinado. Se puede vender directamente como un aceite y puede estar contenido en un envase adecuado, normalmente botellas de aluminio de una sola pieza con un recubrimiento interno de laca epoxifenólica y purgadas con nitrógeno. El aceite puede contener uno o más antioxidantes (p. ej., tocoferol, vitamina E, palmitato) cada uno, por ejemplo, en una concentración de 50 a 800 ppm, tal como de 100 a 700 ppm.

- 35 Las composiciones adecuadas pueden incluir composiciones farmacéuticas o veterinarias, p. ej., de administración oral, composiciones cosméticas. El aceite se puede tomar como tal, o puede estar encapsulado, por ejemplo, en una cubierta, y por lo tanto puede estar en forma de cápsulas.

La cubierta o las cápsulas pueden comprender gelatina y/o glicerol. La composición puede contener otros ingredientes, por ejemplo, saborizantes (p. ej., sabor a limón o lima) o un portador o un excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable.

### *Desespumantes*

- 40 Durante la desaireación, puede que se formen burbujas de gas en el líquido acuoso. Esto puede ocurrir durante el proceso de desgasificación, ya que se liberan los gases de la solución y ascienden (como burbujas) hacia la superficie del líquido acuoso. Como cabe esperar, esto puede dar lugar a que se forme una espuma sobre el líquido acuoso. Si no se desea la formación de espuma, esta se puede reducir o prevenir agregando uno o más desespumantes al líquido acuoso. Dichos desespumantes se emplean habitualmente en la materia y, entonces, se puede emplear el desespumante adecuado, por ejemplo, fosfato de tributilo. El desespumante es preferentemente de naturaleza hidrófoba y pueden ser insolubles en agua. Puede comprender una cadena hidrocarbonada apolar, por ejemplo, modificada por un grupo polar. Los desespumantes preferidos incluyen aceite de silicona, parafina, alcoxilato de alcoholes grasos y/o un poliglicol.

- 50 Los desaireantes químicos preferidos incluyen alcoholes alifáticos, ésteres de ácidos grasos, etoxilatos de ácidos grasos, poliéteres de ácidos grasos y/o alcoholes grasos.

La desaireación puede tener otros beneficios, especialmente si las células microbianas se van a calentar, por ejemplo, se tienen que matar o someter a pasteurización. Las células o el líquido acuoso (o una composición cualquiera que comprenda las células en el estado apropiado) se pueden someter a temperaturas elevadas y/o

presiones elevadas durante el calentamiento o la pasteurización. Esto puede hacer que se desprendan gases de forma repentina o violenta del líquido acuoso, por ejemplo, puede provocar la cavitación en bombas durante la transferencia de las células microbianas. Esto no es conveniente, ya que puede provocar daños en la pared de las células, es decir, romper las células. Por lo tanto, un paso previo de desaireación puede recudir los posibles problemas que puedan surgir como consecuencia de las temperaturas o presiones elevadas, por ejemplo, durante el calentamiento o la pasteurización.

*Equipo (p. ej., planta de proceso industrial)*

También se presenta un instrumento adecuado para llevar a cabo el proceso de la invención. Así pues, el instrumento comprende:

- 10 (a) un medio para cultivar (o fermentar) células microbianas (p. ej., un fermentador), opcionalmente ligado a un;
- (b) medio para desairear un líquido acuoso que contiene las células microbianas; y
- (c) opcionalmente, un medio para obtener un aceite (como resultado) de las células microbianas.

15 En una realización, la desaireación de (b) puede tener lugar cuando las células están (aún) en el fermentador. Como alternativa, el medio para desairear puede estar separado (aunque opcionalmente conectado con) el medio para desairear de (b). De forma que las células y el medio de cultivo (p. ej., caldo) se hagan pasar o se transfieran (p. ej., directamente) al medio de desaireación de (b). También puede existir un medio para la pasteurización. Después de la desaireación de (b), el líquido desaireado se puede transferir o hacer pasar a un medio de pasteurización, o a un recipiente en el cual el líquido (y las células) se pasteuriza. Cada uno de los medios se puede colocar en el orden especificado, en el orden las etapas del proceso del primer aspecto.

20 En un sistema preferido, el líquido acuoso se puede transferir desde un fermentador a un sistema de calentamiento (convenientemente tubular). El líquido acuoso se puede (pre)calentar, lo cual puede causar desaireación de por sí. El líquido se puede calentar hasta una temperatura de 40 a 80°, como de 50 a 70°, como de 55 a 65°C. Por lo tanto, el calentamiento (o etapa de precalentamiento) puede ser parte del sistema de desaireación. Se fomenta la desaireación además agregando agua (la técnica de dilución) y/o vapor (la técnica de desplazamiento gaseoso).

25 Una o ambas de estas técnicas se pueden llevar a cabo antes de (pre)calentar.

Después de, p. ej., precalentar, el líquido acuoso se puede someter a una etapa extra de desaireación, por ejemplo, reducción al vacío o a presión. El líquido se puede someter posteriormente a pasteurización.

Las peculiaridades y características preferidas de un aspecto de la invención se pueden aplicar a otro aspecto *mutatis mutandis*.

30 La invención se describirá ahora, a modo de ejemplo, haciendo referencia a los siguientes ejemplos, los cuales se presentan a modo ilustrativo y no se pretende que limiten el alcance.

Ejemplo 1 de comparación y Ejemplos de 2 a 4 (desaireación dentro del fermentador)

35 En algunos experimentos que implicaban la pasteurización de biomasa fúngica (*Mortierella alpina*) se detectó algo de oxidación. Se sospechaba que la explicación era la presencia de aire en el caldo de fermentación, lo cual producía la oxidación química, especialmente a temperaturas elevadas. Aunque las células microbianas necesitan aire para sobrevivir y biosintetizar AGPI, se decidió implementar la desaireación del caldo de fermentación en el fermentador, antes de la pasteurización (tratamiento por choque térmico).

40 La fermentación de una biomasa fúngica, *M. alpina*, se llevó a cabo como se describió previamente en la materia. La fermentación se llevó a cabo de forma similar a la que se describe en WO 97/36996 (remítase a los Ejemplos). La fermentación duró aproximadamente 150- 200 horas. El caldo se transfirió desde el fermentador a través de un recipiente pequeño (capacidad de 350 litros) hasta el equipo de pasteurización.

Se llevaron a cabo ensayos en caldos de fermentación de varias fermentaciones similares con tiempos de fermentación de 150 a 200 horas.

45 En el primer grupo de experimentos, los ensayos se realizaron directamente en el caldo mientras aún estaba dentro del fermentador empleando diferentes métodos de desaireación, entre ellos detener el burbujeo de aire en el caldo mediante el burbujeador durante 2 horas antes del final de la fermentación (Ejemplo 2) y emplear nitrógeno para reemplazar el aire en el espacio libre encima del caldo de fermentación (Ejemplos 3 y 4). No se aplicaron métodos de desaireación para el Ejemplo 1 de comparación.

50 La biomasa seca obtenida en los ensayos de choque térmico se analizó para determinar su RTP (recuento total en placa). Los resultados de RTP no se desviaron de los medidos en el caldo pasteurizado en condiciones estándares. El caldo, una vez desaireado y pasteurizado, se empleó para aislar un aceite microbiano/unicelular que contenía ácido araquidónico (ARA). Se recuperó el aceite crudo que contenía el ácido araquidónico y se analizó. El sistema de recuperación implicaba, una vez desaireado y pasteurizado el caldo, agregar cloruro de calcio, filtrar/lavar y

## ES 2 563 649 T3

comprimir para formar una pasta húmeda. Posteriormente, se extruyó esta pasta húmeda para formar un extrusado, que se secó, y la biomasa seca resultante se sometió a extracción.

Se comprobó que aproximadamente un litro de caldo contenía de 45 a 55 gramos de biomasa seca, con aproximadamente de un 30 a un 35% de aceite.

5 Se empleó el siguiente proceso de recuperación a escala de laboratorio. Se realizó la adición de cloruro de calcio empleando recipientes de laboratorio de vidrio, con copos de cloruro de calcio y agua. Se empleó una solución de cloruro de calcio al 25% p/p empleando  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Se agregaron 24 gramos de la solución a un litro de caldo pasteurizado y se mezcló bien.

10 La filtración se empleó para simular la prensa del filtro de membrana. Se empleó un filtro "Seitz" de un litro, con un fieltro Sefar Fyltis AM 25116. Se filtró un litro del caldo con nitrógeno a una presión de 0.5 a 1 bar. Posteriormente, se despresurizó y se agregó agua de lavado en una cantidad que era 0.6 veces el volumen del caldo, sin perturbar la pasta durante la adición de agua. La pasta se lavó posteriormente a una presión de 0.5 a 1 bar, y la pasta se secó con un secador eléctrico durante aproximadamente un minuto.

15 Posteriormente, se llevó a cabo la filtración al vacío empleando un filtro de cinta de filtración Pannevis a escala de laboratorio empleando fieltro Pannevis. Se emplearon aproximadamente de 400 a 500 ml de caldo, se filtraron a una presión de 0.45 bara (-0.55 bar de vacío). Posteriormente, se agregó agua de lavado en una cantidad que era 0.6 veces el volumen del caldo, y la pasta se lavó con una presión de 0.45 bara. A continuación, la pasta se secó por succión.

20 Posteriormente, se comprimió la masa, entre placas, hasta que no se pudo eliminar más agua. Esto se llevó a cabo empleado gasa.

La extrusión se llevó a cabo posteriormente empleando un extrusor tipo picador de carne (Victoria). Los gránulos resultantes se secaron posteriormente empleando un secador de lecho fluidizado, con una temperatura de entrada de 50 °C y con la velocidad de flujo ajustada a "5" durante 30 minutos. La materia seca fue de entre un 91 y un 96%.

25 Posteriormente, se llevó a cabo la extracción, extrayendo 100 gramos de biomasa seca con 500 ml de hexano a temperatura ambiente durante 60 minutos. El hexano se decantó y la pasta se lavó con 250 ml de hexano nuevo a temperatura ambiente durante 30 minutos. El hexano se decantó y se agregó al hexano que se había extraído previamente. El extracto se clarificó por filtración al vacío empleando un filtro de vidrio.

30 La evaporación implicó evaporar la mayor parte del hexano en el rotavapor con una temperatura del baño de agua de 60 a 70 °C a 200 mbara durante 5-10 minutos. El hexano remanente también se evaporó a la misma temperatura durante 10-20 minutos a menos de 100 mbara. Para minimizar la oxidación, el sistema se despresurizó empleando nitrógeno.

El aceite que contenía ARA resultante se analizó posteriormente para determinar sus índices IP e IAn como se muestra a continuación en la Tabla 1.

35 Tabla 1

Ejemplo N.º	Lote de Fermentación	Condiciones del proceso	Condiciones del proceso de pasteurización		IP [meq/kg]	IAn [-]
			[°C]	[s]		
1 (comp.)	B-03036	• Estándares*	100	10	16.5	24.3
2	B-03050	• Sin aire en el burbujeador durante 2 h • Aire en el espacio libre • 60 rpm	100	10	10.8	10.6
3	B-03050	• N <sub>2</sub> 1 hora • N <sub>2</sub> en el espacio libre a 0.6 bar	100	10	9.8	13.2
4	B-03067	• Sin aire en el burbujeador durante 2 h	100	10	8.0	5.5

		<ul style="list-style-type: none"> <li>• N<sub>2</sub> en el burbujeador durante 2h</li> <li>• N<sub>2</sub> en el espacio libre a 0.6 bar</li> <li>• 40 rpm</li> </ul>				
--	--	---	--	--	--	--

\* El caldo se transfirió mediante una presión de descarga de 1.8 – 2 bar en el fermentador.

Como se puede observar a la vista de los datos de la Tabla 1, la reducción de la cantidad de aire en el caldo produjo la mejora del IP y/o el IAn. Sobre la base de estos resultados, se creyó que la desaireación podría producir una menor oxidación, y unos mejores valores de IP e IAn. Posteriormente, se preparó otro ensayo con un volumen mayor empleando un desaireador separado.

5

Ejemplos 5 a 14 (desaireador separado)

Se instaló un sistema de desaireación permanente, con una "tobera de tipo paraguas", a una presión de trabajo inferior a 500 mbara. La transferencia del caldo de fermentación desde el fermentador hasta el desaireador fue realizada por acción de una bomba de cizallamiento bajo (bomba monho).

10

El sistema de desaireación, después de la fermentación pero antes de la pasteurización, se instaló empleando un sistema de desaireación APV para imitar a un desaireador parasol. El fermentador se ligó al desaireador y el caldo se transfirió con una presión de transferencia de 0.5 bar. El desaireador se conectó a una bomba de vacío. Después de pasar por el desaireador, la biomasa se envió (por acción de una bomba monho) a un tanque colector, antes de enviarla a pasteurizar empleando un equipo de tratamiento por choque térmico (también APV). La bomba monho tenía una velocidad de flujo de 10 m<sup>3</sup>/hora y la presión dentro del desaireador era de 400 mbara.

15

La Tabla 2 muestra los resultados del ensayo realizado empleando esta configuración para la desaireación. El aislamiento del aceite microbiano y su análisis se realizaron como se describió anteriormente.

Tabla 2

Ejemplo N.º	Lote de ferm.	Condiciones del proceso	Condiciones del proceso de pasteurización		Presión de desaireación [mbara]	IP [meq/kg]	IAn [-]
			[°C]	[s]			
5	B-031096	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sin aire en el burbujeador durante 1 h</li> <li>• P en el espacio libre = 0.2 bar</li> <li>• PTF = 0.5 bar</li> </ul>	100	15	400	4.9	13.1
6	B-03102	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sin aire en el burbujeador durante 1 h</li> <li>• P en el espacio libre = 0.2 bar</li> <li>• PTF = 0.5 bar</li> </ul>	120	15	400	17.2	36.3
7	B-03102	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sin aire en el burbujeador durante 1 h</li> <li>• P en el espacio libre = 0.2 bar</li> <li>• PTF = 0.5 bar</li> </ul>	100	15	400	11.7	19.0
8	B-03104	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sin aire en el burbujeador durante 1 h</li> </ul>	100	15	400	4.9	7.4

ES 2 563 649 T3

		<ul style="list-style-type: none"> <li>h</li> <li>• P en el espacio libre = 0.2 bar</li> <li>• PTF = 0.5 bar</li> </ul>					
9	B-03079	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sin aire en el burbujeador durante 1 h</li> <li>• P en el espacio libre = 0.2 bar</li> <li>• PTF = 0.3 bar (12 m<sup>3</sup>)</li> <li>• PTF = 0.7 bar (28 m<sup>3</sup>)</li> </ul>	100	15	400	5.6	9.0
10	B-03081	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sin aire en el burbujeador durante 1 h</li> <li>• P en el espacio libre = 0.1 bar</li> <li>• PTF = 0.3 bar (10 m<sup>3</sup>)</li> <li>• PTF = 0.7 bar (resto del caldo)</li> </ul>	100	15	400	2.9	6.2
11	B-03141	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sin aire en el burbujeador durante 1 h</li> <li>• P en el espacio libre = 0.1 bar</li> <li>• PTF = 0.6 bar</li> </ul>	100	15	400	7.6	18.4
12	A-03092	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sin aire en el burbujeador durante 2 h</li> <li>• P en el espacio libre = 0.1 bar</li> <li>• PTF = 0.6 bar</li> </ul>	100	15	400	7.8	17.1
13	A-03093	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sin aire en el burbujeador durante 2 h</li> <li>• P en el espacio libre = 0.1 bar</li> <li>• PTF = 0.7 bar</li> </ul>	100	15	400	9.3	23.1
14	A-03095	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sin aire en el burbujeador durante 2 h</li> <li>• P en el espacio libre = 0.1 bar</li> <li>• PTF = 0.7 bar</li> </ul>	100	15	400	5.2	7.9

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para producir un aceite que comprende ácido araquidónico (ARA), comprendiendo el proceso:

(a) desairear un líquido acuoso que comprende células microbianas que son *Mortierella alpina*, en el cual la desaireación elimina al menos parte del oxígeno disuelto y/o sin disolver; y

5 (b) obtener el aceite de las células,

en el cual el líquido acuoso es un caldo de fermentación y en el cual las células se calientan o pasteurizan después de la desaireación de (a) pero antes de la etapa (b).

10 2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual el calentamiento es directo y mediante la introducción de vapor en el fermentador o indirecto mediante un intercambiador de calor, ya sea a través de la pared del fermentador o con serpentines de calentamiento, o un intercambiador de calor externo tal como un intercambiador de calor de placas.

3. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende además:

(c) extraer, purificar o aislar el aceite.

4. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual la desaireación comprende:

15 a) aplicación de vacío (o presión reducida);

b) desaireación /desgasificación mecánica (agitación, vibración, empleo de fuerzas aceleratrices o la fuerza de la gravedad, como en una centrifugadora o un ciclón);

c) cambio de viscosidad (por dilución con agua u otro líquido, o por aumento de temperatura);

20 d) una reducción de la ventilación, inyección de aire, o el suministro de oxígeno o aire durante la fermentación, o una reducción de la velocidad de agitación;

e) reducción del pH o acidificación;

f) filtración, por ejemplo, empleando un filtro o membrana que comprende preferentemente un polímero (inerte), por ejemplo, PTFE;

g) desplazamiento gaseoso, con un gas inerte como el nitrógeno, un gas noble como el helio o vapor;

25 h) desaireación química, por ejemplo, empleando un capturador de oxígeno, por ejemplo, sulfito sódico o hidrazina;

i) tiempo, como para permitir que el líquido acuoso repose o en condiciones que permitan que el oxígeno o el aire se elimine por difusión del líquido;

o una combinación de uno o más de los métodos de (a) a (i).

30 5. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual la desaireación se consigue por reducción de la agitación y/o por desplazamiento gaseoso, y, opcionalmente, en el cual

j) el desplazamiento gaseoso se realiza empleando un gas que no comprende oxígeno o que comprende oxígeno con un nivel de concentración inferior al aire atmosférico; y/o

k) el gas es, o comprende, nitrógeno.

35 6. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual la desaireación comprende someter al líquido acuoso a presión reducida, y, opcionalmente, en el cual

l) dicha presión reducida es una presión no superior a 800 mbares absolutos, preferentemente no superior a 600 mbares absolutos; y/o.

40 m) el líquido acuoso se desairea empleando una bomba de vacío o de desgasificación, un desaireador parasol o una tobera de tipo paraguas.

7. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual la desaireación da como resultado un contenido de O<sub>2</sub> en el líquido acuoso inferior a 20 ppm, preferentemente inferior a 10ppm.

8. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual la desaireación da como

resultado una concentración de oxígeno disuelto inferior a 10 ppm, preferentemente inferior a 5 ppm, más preferentemente inferior a 2 ppm.

9. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual el proceso comprende someter el líquido acuoso desaireado a

5 (i) una presión superior a 1 bar absoluto, preferentemente superior a 1.5 bares absolutos, más preferentemente superior a 2 bares absolutos; y/o

(ii) una temperatura superior a 60 °C, preferentemente superior a 80 °C, más preferentemente superior a 100 °C.

10 10. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual las células se calientan o pasteurizan a una temperatura superior a 80 °C, preferentemente superior a 90 °C, preferentemente superior a 100 °C.

11. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual el aceite es un aceite microbiano que comprende al menos un 35% de ARA.

15 12. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 11, en el cual el aceite microbiano comprende al menos un 40% de ARA.

13. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual el aceite tiene un IP inferior a 12 meq/kg y/o un IAn inferior a 20.