

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 624 952**

51 Int. Cl.:

C12P 7/64 (2006.01)

C11B 1/10 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

C12M 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2004 E 10174824 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017 EP 2251429**

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:

18.07.2017

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

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 624 952 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

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un proceso para producir un aceite, o un ácido graso poliinsaturado (PUFA). El proceso implica desairear un líquido acuoso que comprende células de las que se obtiene (posteriormente) el aceite o PUFA. Después de la desaireación, las células pueden pasteurizarse. El aceite o PUFA después puede extraerse, purificarse o aislarse de las células.

Antecedentes de la invención

15 Los ácidos grasos poliinsaturados o PUFA, se encuentran de forma natural y se produce una amplia diversidad de diferentes PUFA por diferentes organismos unicelulares (algas, hongos, etc.). Un PUFA particularmente importante es ácido araquidónico (ARA) que es uno de varios ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA). Químicamente, el ácido araquidónico es ácido *cis*-5,8,11,14 eicosatetraenoico (20:4) y pertenece a la familia (n-6) de LC-PUFA.

20 El ácido araquidónico es un precursor principal de una amplia diversidad de compuestos biológicamente activos, conocidos colectivamente como eicosanoides, un grupo que comprende prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos. El ácido araquidónico es también uno de los componentes de la fracción lipídica de la leche materna humana y se cree que es esencial para el desarrollo neurológico óptimo en lactantes. El ácido araquidónico tiene una amplia diversidad de aplicaciones diferentes, incluyendo su uso en fórmulas infantiles, productos alimenticios y piensos para animales.

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

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

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

35 Se conocen procesos que implican el calentamiento de biomasa o células microbianas. El documento WO-A-97/37032 describe que las células microbianas pueden pasteurizarse antes de la extracción de un PUFA desde la misma, en forma de un aceite. Sin embargo, los presentes solicitantes descubrieron que la inclusión de un proceso de desaireación puede mejorar la calidad del aceite que puede extraerse de las células. En particular, el aceite resultante puede oxidarse menor, o estar menos oxidado, y puede tener un valor de peróxido (POV) y/o un valor de anisidina (AnV) inferior.

Descripción de la invención

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

La presente invención, por lo tanto, se refiere a un proceso para producir un aceite o un ácido graso poliinsaturado (PUFA), comprendiendo el proceso:

- 50 (a) desairear un líquido acuoso que comprende células microbianas, donde la desaireación retira al menos parte del oxígeno disuelto y/o no disuelto; y
(b) obtener el aceite o PUFA de las células,

donde el líquido acuoso es un caldo de fermentación y donde las células se pasteurizan después de la desaireación en (a) pero antes de la fase (b); y donde el aceite comprende al menos un 10% de ácido araquidónico (ARA) y/o las células son del género *Mortierella*.

El caldo de fermentación puede ser un líquido recogido o retirado durante la fermentación, aunque preferiblemente es un caldo del final de la fermentación. Las células microbianas pueden estar vivas antes, durante y/o después de la desaireación.

60 La desaireación del líquido acuoso preferiblemente provoca la eliminación del aire, tal como aire arrastrado, atrapado, no disuelto y/o disuelto. El proceso, por lo tanto, puede ser de forma eficaz, o comprende, una desgasificación. Puede retirar el gas (por ejemplo, burbujas de aire). Preferiblemente, el proceso retirará el oxígeno, tal como oxígeno disuelto (por ejemplo, en una forma atrapada, o como burbujas). En este contexto "disuelto" se refiere al gas, tal como aire u oxígeno, que está presente o disuelto en el líquido acuoso (en lugar de cualquier gas dentro de las células).

El proceso de desaireación también puede provocar que se retiren otros gases del líquido acuoso, por ejemplo, dióxido de carbono.

- 5 La desaireación, como retira al menos parte del oxígeno disuelto y/o algo del oxígeno no disuelto, puede provocar una oxidación reducida. Esto puede significar que el PUFA y/o el aceite puedan estar menos oxidado y, por lo tanto, ser de mejor calidad.

10 No es inmediatamente evidente que la retirada del oxígeno sea ventajosa porque, por supuesto, las células microbianas requieren oxígeno para ser capaces de sobrevivir y crecer. De hecho, en muchos procesos de fermentación, incluyendo los procesos preferidos de la invención, se suministra aire a las células microbianas, por ejemplo, se suministra (tal como se burbujea) el líquido acuoso o medio de cultivo. Las células se dividirán y crecerán, y preferiblemente al hacerlo también biosintetizarán uno o más PUFA. La idea, entonces, de detener el suministro de oxígeno o aire durante el proceso de fermentación para lograr la desaireación, no necesariamente se consideraría una estrategia ventajosa porque esto podría provocar que las células murieran o, como mínimo, podría verse comprometida su capacidad de producir PUFA y otros compuestos valiosos.

20 Se conoce la desaireación para productos alimenticios, tales como leche y zumo de naranja, y también en algunos procesos industriales, tal como en la fabricación de papel. Sin embargo, se percibirá que estos procesos están en un campo diferente del de la fermentación de organismos microbianos, en particular para producir un compuesto a extraer, y en aquellos sistemas (técnica anterior) en que no hay células (vivas). En algunos procesos de la técnica anterior, la desaireación se realiza para reducir el crecimiento bacteriano, mientras que en la presente invención el crecimiento y supervivencia de las células microbianas (incluyendo células bacterianas), para producir los PUFA, es un elemento importante del proceso de fermentación que requiere oxígeno.

25 Hay varias maneras de realizar la desaireación, incluyendo las siguientes:

- a) aplicación de vacío (o presión reducida);
- b) desaireación/desgasificación mecánica (agitación, vibración, uso de fuerzas de aceleración, por ejemplo, fuerza g, tal como en un centrífuga o un ciclón);
- 30 c) cambios de viscosidad (por dilución con agua u otros líquidos, o por cambio de temperatura);
- d) cambio en las condiciones de fermentación, por ejemplo, una reducción en la columna de aire, la aspersión de aire o el suministro de oxígeno o aire durante la fermentación, o una reducción en la tasa de agitación;
- e) cambio de pH, por ejemplo, disminuyendo el pH o la acidificación (por ejemplo, usando dióxido de carbono, que cuando se disuelve en el líquido forma ácido carbónico);
- 35 f) filtración, por ejemplo, usando un filtro, capilar o membrana, tal como un polímero (preferiblemente inerte), por ejemplo, PTFE;
- g) desplazamiento de gases, con un gas inerte tal como nitrógeno o un gas noble tal como helio;
- h) desaireación química, por ejemplo, usando un aceptor de oxígeno, por ejemplo, sulfito sódico o hidrazina;
- i) tiempo, tal como permitiendo que el líquido acuoso repose o en condiciones que permiten que un gas, tal como oxígeno o aire, difunda del líquido; y/o
- 40 j) una combinación de uno o más de los métodos anteriores.

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

45 **1. Vacío (o presión reducida)**

Puede aplicarse un vacío sobre la superficie del líquido acuoso. Sin embargo, un verdadero vacío no siempre tiene que ser necesario, en su lugar un método preferido implica una reducción de la presión sobre la superficie del líquido acuoso, por ejemplo, cuando está en un recipiente, tal como un recipiente de fermentación. Preferiblemente, la presión sobre el líquido acuoso es menor que la presión atmosférica o ambiente, o al menos representa una reducción en la presión en comparación con la presión dentro del recipiente fermentador (o presión durante la fermentación). Por tanto, puede haber una reducción de presión cuando tiene que empezarse la desaireación, por ejemplo, una vez a acabado la fermentación.

55 El vacío o presión reducida puede aplicarse en un recipiente separado a aquel en que tiene lugar la fermentación (tal como el fermentador). El líquido, por lo tanto, puede transferirse a una estación de trabajo de vacío o un recipiente diferente cuando se aplica o puede estar presente un vacío. En este contexto, cuando se analiza la aplicación de un "vacío" como uno de los métodos de desaireación, esta debe entenderse como la aplicación de presión reducida al líquido acuoso. Esto es porque no es absolutamente esencial que se aplique un vacío total.

60 Preferiblemente, la presión aplicada (durante la fase de desaireación por vacío) es de no más de 800, preferiblemente no más de 600 y óptimamente de no más de 400 mbar (presión absoluta en milibares). En ciertas circunstancias, usando el equipo correcto, la presión es preferiblemente de no más de 200 o 100 mbar. Preferiblemente, la presión reducida es de 50 a 600 mbar, tal como de 100 a 500 mbar y óptimamente de 200 a 450 mbar.

65

En una realización preferida, el líquido acuoso, tal como después de la fermentación, se transfiere a un recipiente que tiene una presión reducida, en otras palabras, una presión menor que el fermentador (u otro recipiente del que se está transfiriendo el líquido acuoso). La transferencia del líquido acuoso desde estos dos recipientes (tal como de un fermentador a un recipiente de presión reducida) puede verse asistida, o puede causarse, por esa diferencia en la presión. Por lo tanto, puede haber una presión de transferencia, que representa la presión a la que el líquido acuoso se somete durante el movimiento de un recipiente al otro. Esta presión de transferencia es preferiblemente de no más de 0,7, tal como de 0,6 y preferiblemente de no más de 0,5 bar. La presión de transferencia puede ser entre 0,7 y 0,3 bar, tal como de 0,6 a 0,4 bar.

El recipiente de presión reducida puede tener un medio para aumentar el área superficial del líquido acuoso, para ayudar a la desaireación. Por tanto, el líquido acuoso puede adoptar la forma de una película, tal como una película fina. El líquido acuoso puede impulsarse en una película (tal como una película fina) por un dispositivo mecánico, por ejemplo, una boquilla, tal como una boquilla de tipo paraguas o un desaireador de tipo parasol. El líquido acuoso, por lo tanto, puede impulsarse a una superficie curvada mientras la se aplica la presión reducida. Aumentar el área superficial del líquido acuoso, tal como formando una película o una pulverización, esto puede ayudar al proceso de desaireación, y puede producir una desgasificación más eficaz. El nivel del líquido acuoso dentro del recipiente de vacío reducido (que contendrá la boquilla o superficie curvada sobre la que se impulsa el líquido acuoso) puede ser de 1 a 2 décimas partes lleno. Después el líquido acuoso desaireado puede transferirse a un recipiente o estación de trabajo de pasteurización o calentamiento.

2. *Desaireación mecánica*

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

Durante la fermentación, el líquido acuoso puede agitarse. Para la desaireación, la cantidad de agitación (o tasa de agitación) puede reducirse o ralentizarse, o detenerse por completo. La agitación reducida es menos probable que cause cavitación, tal como en o cerca de la hoja de agitación o la superficie o superficies en movimiento, y es menos probable que cree burbujas (en el líquido acuoso).

Detener la agitación, o reducir el grado de agitación, puede permitir que las burbujas en el líquido acuoso se junten, y de ese modo suben hacia la superficie del líquido acuoso. Durante esta reducción de la agitación, la tasa de agitación puede reducirse hasta no más de la mitad, un tercio o incluso una cuarta parte, de aquella durante la fermentación. Por ejemplo, si la tasa de agitación es 80 rpm, la agitación reducida, para permitir la desaireación, puede implicar agitación a una tasa de no más de 40 rpm.

La desaireación mecánica también puede implicar la reducción en la cantidad de aire u oxígeno suministrada al líquido acuoso (caldo de fermentación, mediante aireación). La tasa de adición de aire u oxígeno puede ralentizarse o detenerse por completo. Durante la desaireación, la tasa de suministro de aire (u oxígeno) puede reducirse hasta no más de la mitad, un tercio o incluso una cuarta parte (tal como de la tasa durante la fermentación). Por tanto, la aireación del líquido puede detenerse o cesar antes del final de la fermentación (por ejemplo, durante hasta 5, 2 o 1 hora).

A menudo se suministra aire (u oxígeno) al líquido acuoso durante la fermentación, y mientras está en el recipiente de fermentación (o fermentador). Se permite que el gas burbujee en el líquido acuoso y esto puede ser mediante un rociador. La desaireación puede implicar la reducción de la tasa de suministro de aire u oxígeno mediante el rociador.

La desaireación también puede conseguirse por vibración, donde el líquido acuoso se pasa a través de o a un recipiente de vibración (estático), tal como un tubo.

El líquido acuoso puede desairearse usando una bomba de desgasificación. El líquido acuoso puede someterse a fuerzas de aceleración, por ejemplo, en un ciclón. El líquido, por lo tanto, puede someterse a la fuerza centrífuga que puede ayudar en la desaireación. El ciclón puede rotar rápidamente el líquido acuoso y someterlo a la fuerza centrífuga, en un recipiente por el que los gases que escapan del líquido pueden subir, y pueden recogerse o retirarse de la parte superior del ciclón, mientras que el líquido que se ha desaireado puede fluir en la dirección opuesta (tal como hacia abajo).

Puede emplearse un desaireador mecánico de vacío para desairear el líquido acuoso. Este puede ser una bomba a la que puede aplicarse un vacío (o presión reducida). Están disponibles en el mercado bombas modificadas (por ejemplo, centrífugas), que pueden aceptar una presión reducida, o pueden generar un vacío. Preferiblemente, la bomba de vacío tendrá una cámara rotatoria, donde las burbujas de gas pueden retirarse del líquido acuoso, por ejemplo, bajo la acción de la fuerza centrífuga.

Los tipos alternativos de equipo incluyen bombas de desgasificación. Estas pueden ser capaces de lograr la

desgasificación de líquidos disueltos en gas. La bomba puede tener una bomba de vacío (por ejemplo, acoplada). Puede ser capaz de realizar la desgasificación sin ningún aditivo químico. Dichos sistemas pueden ser capaces de desgasificar hasta un nivel de 0,5 ppm o menos. Pueden ser capaces de tener un caudal de 25 litros/minuto o menos. Las bombas adecuadas de desgasificación están disponibles en Yokota Manufacturing Company en Japón.

3. Ajuste de viscosidad

Puede conseguirse un aumento en la viscosidad calentando el líquido acuoso. Este calentamiento también puede provocar desaireación.

Una reducción en la viscosidad puede permitir que los gases en el líquido acuoso salgan a la superficie de manera más eficaz. Por tanto, los métodos de reducción de la viscosidad pueden ayudar en el proceso de desaireación. Esto puede conseguirse añadiendo otro líquido (desaireado en sí mismo, o con un contenido inferior de aire/oxígeno que el líquido acuoso), tal como agua, y de ese modo el proceso puede comprender dilución. El líquido acuoso a menudo es bastante viscoso debido a la presencia de células y fuentes de nitrógeno y/o carbono para su asimilación por las células.

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 de pH

El líquido acuoso puede hacerse más ácido. Esto puede disminuir la solubilidad del aire/oxígeno en el mismo.

Logrará que el líquido acuoso comprenda células vivas que pueden sintetizar compuestos valiosos. Las células "respiran" en el sentido en que consumen oxígeno, y liberan dióxido de carbono. El dióxido de carbono puede disolverse en el líquido acuoso, y al hacerlo produce ácido carbónico. Disminuyendo el pH, esto puede hacer que el líquido acuoso sea más ácido, y de ese modo reduce la solubilidad del dióxido de carbono (u oxígeno) en el mismo.

5. Filtración

El líquido acuoso puede pasarse a través de un filtro o membrana que puede ser capaz de retirar pequeñas burbujas, tales como de aire. Esto puede realizarse a una escala relativamente pequeña. Un filtro o membrana preferiblemente comprende un material inserte, tal como un polímero. El material (por ejemplo) de polímero puede comprender un alquileo con halógeno, tal como PTFE.

El líquido acuoso, por lo tanto, puede pasarse a través de un tubo o capilar (por ejemplo, un pequeño o relativamente fino). Este puede comprender (por ejemplo, en una pared) o tener (un recubrimiento de) un polímero, tal como PTFE. El tubo puede tener orificios o aberturas a través de las cuales pueden pasar los gases disueltos o burbujas. El líquido acuoso puede pasarse a través de estos tubos o capilares a presión.

6. Desplazamiento de gases

Esto implica desplazar o reemplazar el oxígeno o el aire (disuelto o de otro modo) en el líquido acuoso. El aire o el oxígeno puede reemplazarse por muchos de una amplia gama de gases, siempre que, preferiblemente, el oxígeno disuelto se impulse fuera de la solución, y después pueda abandonar el líquido acuoso. Se prefiere un gas inerte, por ejemplo, nitrógeno, o un gas noble, tal como helio. El gas puede proporcionarse por encima, sobre la parte superior del líquido acuoso (tal como en el espacio vacío del fermentador). Por ejemplo, puede añadirse o suministrarse al espacio vacío por encima del líquido, por ejemplo, en un recipiente tal como un fermentador. Como alternativa, el gas puede suministrarse al líquido acuoso, por ejemplo, por burbujeo o por el uso del rociador. El gas preferido es nitrógeno, aunque puede emplearse un gas que comprenda nitrógeno (pero con una cantidad reducida de oxígeno, tal como por debajo del 20% o por debajo del 10% o el 15%, de modo que esté por debajo de los niveles atmosféricos).

La técnica preferida es reducir, o detener, la cantidad de aire (u oxígeno) suministrada al líquido acuoso antes de finalizar la fermentación. En primer lugar, por ejemplo, puede no suministrarse aire, por ejemplo, a través de un rociador, durante al menos una o dos horas antes del final de la fermentación. En lugar de suministrar aire a través del rociador, se puede suministrar un gas diferente de aire u oxígeno, por ejemplo, uno con un contenido reducido de oxígeno, por ejemplo, nitrógeno. Por tanto, preferiblemente, se puede suministrar nitrógeno al líquido acuoso hasta una o dos horas antes del final de la fermentación. Esto puede crear una atmósfera inerte o con contenido reducido de oxígeno (por ejemplo, rica en nitrógeno) por encima del líquido acuoso, por ejemplo, una atmósfera que tiene un contenido mayor de nitrógeno que el aire atmosférico. La presión de nitrógeno por encima del líquido acuoso puede ser de 0,4 a 0,8 bar, tal como de aproximadamente 0,6 bar.

7. Desaireación química

Esto se puede conseguir usando una sustancia o agente químico que pueda reaccionar ventajosamente con el aire o, de forma más importante, el oxígeno en el aire. La sustancia puede ser un aceptor de oxígeno. Esta sustancia puede ponerse en contacto con el líquido acuoso. El agente químico puede añadirse al líquido acuoso, por ejemplo, mientras está en un recipiente, tal como un recipiente fermentador. Los materiales de reacción con oxígeno adecuados, incluyendo los aceptores de oxígeno, son bien conocidos en la técnica e incluyen sulfito de metal alcalino (tal como sodio) y compuestos que comprenden hidrazina. Pueden usarse otros métodos de desaireación (no químicos) si el PUFA o el aceite tiene que usarse en un producto alimenticio.

8. Tiempo

Si se deja reposar, el líquido acuoso se desprenderá lentamente de sus gases disueltos, tales como oxígeno y aire. Los gases disueltos pueden difundir del líquido acuoso. Por tanto, los gases pueden salir gradualmente, con el tiempo, de la solución.

Medición del contenido de aire/oxígeno

Esto puede conseguirse usando técnicas convencionales en la técnica. Por ejemplo, se puede usarse un EGT (equipo de ensayo de gas retenido). La cantidad de aire puede medirse por técnicas en línea en el líquido acuoso (eficazmente una suspensión microbiana de las células).

El gas retenido (burbujas de gas) puede medirse comprimiendo una muestra en una celda de medición. La proporción volumétrica del gas retenido se calcula entonces por la ley de Boyle ($pV = \text{constante}$). Por otro lado, el gas disuelto que puede liberarse puede medirse expandiendo la muestra. Esto estimula una caída abrupta en la presión. Según se reduce la presión en la celda de medición, disminuye la solubilidad de los gases y se liberan. Por tanto, el volumen de la suspensión aumenta. La operación puede ser completamente automática y/o puede comprender un analizador de gas en línea, en un lugar apropiado en el sistema, adecuadamente después de la desaireación.

La desaireación puede provocar un contenido de O_2 (en el líquido acuoso) de menos de 20 o 15 ppm, por ejemplo, de 2 o 5 a 15 o 20 ppm. La concentración del oxígeno (por ejemplo, disuelto) preferiblemente puede ser menor de 10, tal como menor de 5 y óptimamente menor de 2 ppm.

Preferiblemente, la desaireación tiene lugar de modo que la concentración de oxígeno (disuelto) es menor del 0,03 cc/litro (44 ppb), preferiblemente menor de 0,005 cc/litro (7 ppb).

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

En una realización preferida, el proceso de acuerdo con la invención comprende someter el líquido acuoso desaireado a una presión de al menos 1 bar, preferiblemente al menos 1,5 bar, preferiblemente al menos 2 bar, preferiblemente al menos 5 bar. No hay límite superior específico para la presión. El líquido acuoso desaireado puede someterse, por ejemplo, a una presión por debajo de 40 bar, por ejemplo, por debajo de 20 bar.

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, preferiblemente de al menos 80°C, preferiblemente de al menos 90°C, preferiblemente de al menos 100°C, preferiblemente de al menos 110°C. No hay límite superior específico para la temperatura. El líquido acuoso desaireado puede someterse, por ejemplo, a una temperatura por debajo de 150°C.

Preferiblemente, el líquido acuoso desaireado que puede someterse a la temperatura aumentada y/o la presión aumentada tiene el contenido preferido de O_2 y/o la concentración preferida de oxígeno (disuelto) como se describe en este documento.

Proceso de pasteurización

La pasteurización puede tener lugar, habitualmente, después de que la desaireación y/o la fermentación hayan acabado. En una realización preferida, la pasteurización acabará la fermentación, porque el calor durante la pasteurización eliminará las células. La pasteurización, por lo tanto, puede realizarse sobre el caldo de fermentación (o las células del medio líquido (acuoso)), aunque puede realizarse sobre la biomasa microbiana obtenida del caldo. En el primer caso, la pasteurización puede tener lugar mientras las células microbianas aún están dentro del fermentador. La pasteurización tiene lugar preferiblemente antes de cualquier procesamiento adicional de las células microbianas, por ejemplo, granulación (por ejemplo, por extrusión), desmenuzamiento o amasado.

Una vez ha acabado la fermentación, el caldo de fermentación puede filtrarse o tratarse de otro modo para retirar el

agua o el líquido acuoso. Después de la retirada del agua, se puede obtener una "torta" de biomasa. Si no ha tenido lugar la pasteurización, entonces las células desecadas (o torta de biomasa) pueden someterse a pasteurización.

5 La pasteurización puede realizarse calentando (las células) directa o indirectamente. El calentamiento, si es directo, puede ser pasando vapor al fermentador. Un método indirecto puede usar un medio a través de intercambiadores de calor, a través de la pared del fermentador, o con serpentines calentadores, o un intercambiador de calor externo tal como un intercambiador de calor de placa.

10 Habitualmente, la pasteurización tendrá lugar en el recipiente fermentador en que ha sucedido la fermentación. Sin embargo, para algunos organismos (tales como bacterias) a menudo se prefiere retirar las células del recipiente en primer lugar, y después pasteurizar. La pasteurización puede tener lugar antes de otro procesamiento de los organismos, por ejemplo, secado o granulación.

15 La pasteurización habitualmente eliminará la mayoría, o si no todos, los microorganismos. Después de la pasteurización, al menos el 95%, el 96% o incluso el 98% de los microorganismos puede haberse eliminado, es decir, no están vivos.

20 El calentamiento o pasteurización de las células puede lograrse a cualquier temperatura adecuada, preferiblemente a una temperatura de al menos 60°C, preferiblemente al menos 80°C, preferiblemente al menos 90°C, preferiblemente al menos 100°C, preferiblemente al menos 110°C. No hay límite superior específico para la temperatura. La pasteurización puede lograrse, por ejemplo, a una temperatura por debajo de 150°C. Los procesos de pasteurización preferidos se describen en los documentos WO 97/37032 y WO-A-04/001021.

25 *Extracción de un PUFA*

La presente invención puede implicarse la extracción y/o aislamiento de un PUFA de las células (por ejemplo, pasteurizadas). Preferiblemente esto es después de la desaireación y (opcionalmente) también después de la pasteurización.

30 La extracción en primer lugar puede comenzar con la adición de un haluro de metal alcalinotérreo, tal como cloruro de calcio. Las células pueden someterse (después) a filtración, lavado y/o exprimido, para generar una torta húmeda.

35 Las células microbianas después pueden someterse a extrusión y, si fuera necesario, los gránulos extruidos resultantes o producto de extrusión, pueden someterse a secado. Los gránulos secos resultantes, o biomasa seca, después pueden usarse para extraer uno de los PUFA, preferiblemente un aceite que contiene uno o más PUFA. Los procesos de extracción preferidos para preparar un aceite que contiene un PUFA a partir de células microbianas se describen en las solicitudes de patente internacional n.º PCT/EP99/01446 (WO 97/36996), PCT/EP97/01448 (WO 97/37032) y PCT/EP01/08903 (WO 02/10423).

40 *Ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) y aceites microbianos*

45 El PUFA puede ser un único PUFA o dos o más PUFA diferentes. El PUFA o cada uno de ellos puede ser de la familia n-3 o n-6. Preferiblemente es un PUFA C18, C20 o C22. Puede ser un PUFA con al menos 18 átomos de carbono y/o al menos 3 o 4 dobles enlaces. El PUFA puede proporcionarse en forma de un ácido graso libre, una sal, como un éster de ácido graso (por ejemplo, éster metílico o etílico), como un fosfolípido y/o en forma de a mono-, di- o triglicérido.

50 Los PUFA (n-3 y n-6) adecuados incluyen:
 ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6 Ω3), adecuadamente de algas u hongos, tales como *Cryptocodinium* (dinoflagelado) o *Thraustochytrium* (hongo);
 ácido γ-linolénico (GLA, 18:3 Ω 6);
 ácido α-linolénico (ALA, 18:3 Ω 3);
 ácido linoleico conjugado (ácido octadecadienoico, CLA);
 55 ácido dihomo-γ-linolénico (DGLA, 20:3 Ω 6);
 ácido araquidónico (ARA, 20:4 Ω 6); y
 ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 Ω 3).

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

65 El PUFA puede producirse por las células pasteurizadas en el proceso de la invención, tal como una célula microbiana. Esta puede ser una célula de bacteria, alga, hongo o levadura. Se prefieren los hongos, preferiblemente del orden *Mucorales*, por ejemplo, *Mortierella*, *Phycomyces*, *Blakeslea*, *Aspergillus*, *Thraustochytrium*, *Pythium* o *Entomophthora*. La fuente preferida de ARA es de *Mortierella alpina*, *Blakeslea trispora*, *Aspergillus terreus* o *Pythium insidiosum*. Las algas pueden ser dinoflagelados y/o incluyen *Porphyridium*, *Nitzschia* o *Cryptocodinium*

(por ejemplo, *Cryptocodinium cohnii*). Las levaduras incluyen las del género *Pichia* o *Saccharomyces*, tales como *Pichia ciferrii*. Las bacterias pueden ser del género *Propionibacterium*. El aceite microbiano puede ser un líquido (a temperatura ambiente).

5 Se prefiere que la mayoría del PUFA esté en forma de triglicéridos. Por tanto, preferiblemente al menos el 50%, tal como al menos el 60% u óptimamente al menos el 70% del PUFA está en forma de triglicérido. Sin embargo, la cantidad de triglicéridos puede ser mayor, tal como al menos el 85%, preferiblemente al menos el 90%, óptimamente al menos el 93% o el 95% del aceite. De estos triglicéridos, preferiblemente al menos el 40%, tal como al menos el 50% y óptimamente al menos el 60% del PUFA está presente en la posición a del glicerol (presente en la estructura del triglicérido), también conocido en la posición 1 o 3. Se prefiere que al menos el 20%, tal como al menos el 30%, óptimamente al menos el 40% del PUFA esté en la posición b(2).

15 El aceite microbiano puede comprender al menos el 10, 35, 40 o 45% o más de un PUFA deseado, tal como ácido araquidónico. Puede tener un contenido de triglicérido de al menos el 90%, tal como del 92-94%. Típicamente, el aceite microbiano tendrá un contenido de ácido eicosapentaenoico (EPA) por debajo del 5%, preferiblemente por debajo del 1% y más preferiblemente por debajo del 0,5%. El aceite puede tener menos del 5%, menos del 2%, menos del 1% de cada uno de los ácidos grasos C₂₀, C_{20:3}, C_{22:0} y/o C_{24:0}. El contenido de ácido graso libre (FFA) puede ser de no más de 1,0, 0,4, 0,2 o 0,1. El aceite puede tener poco o nada de GLA y/o DGLA.

20 El aceite microbiano puede ser un aceite crudo. Puede haberse extraído de las células usando un disolvente, tal como un líquido orgánico, tal como hexano o isopropanol.

Proceso de extracción de PUFA

25 El PUFA (o aceite microbiano, que comprende habitualmente el PUFA) después puede extraerse de las células microbianas (pasteurizadas). Preferiblemente, se extrae de gránulos (por ejemplo, secos) (por ejemplo, productos de extrusión) que contienen las células. La extracción puede realizarse usando un disolvente. Preferiblemente, se usa un disolvente no polar, por ejemplo, un alcano C₁₋₈, preferiblemente C₂₋₆, por ejemplo, hexano.

30 Preferiblemente, el disolvente se deja filtrar sobre los gránulos secos. Las técnicas adecuadas de granulación y extrusión del microorganismo y la posterior extracción de un aceite que contiene el PUFA microbiano, se describen en el documento WO-A-97/37032.

35 El disolvente permite obtener un aceite crudo que contiene el PUFA. Este aceite puede usarse en ese estado, sin procesamiento adicional, o puede someterse a una o más etapas de refinado. Sin embargo, un aceite crudo es habitualmente uno que contiene un disolvente, tal como un disolvente usado para extraer el aceite (por ejemplo, hexano o un alcohol tal como alcohol isopropílico) o que no se ha sometido a una (o preferiblemente todas) las siguientes etapas de refinado. Los protocolos adecuados de refinado se describen en la solicitud de patente internacional n.º WO02/10322.

40 Por ejemplo, el aceite puede someterse a una o más etapas de refinado que pueden incluir tratamiento ácido o desgomado, tratamiento alcalino o retirado de ácidos grasos libres, blanqueo o eliminación de pigmentos, filtración, hibernación (o enfriamiento, por ejemplo, para retirar los triglicéridos saturados), desodorizado (o eliminación de los ácidos grasos libres) y/o acabado (o eliminación de sustancias insolubles en aceite). Todas estas etapas de refinado se describen en mayor detalle en el documento WO02/10322 y pueden aplicarse a las etapas descritas en la presente solicitud *mutatis mutandis*. se describen en mayor detalle en el documento WO02/10322 y pueden aplicarse a las etapas

50 El aceite resultante es particularmente adecuado para propósitos nutricionales, y puede añadirse a alimentos (para seres humanos) o productos alimenticios (para animales). Los ejemplos incluyen leche, fórmula infantil, bebidas dietéticas, pan y pienso para animales.

Células

55 Las células pueden ser cualquier célula de la que puede obtenerse un aceite o un PUFA. Preferiblemente, las células son células microbianas. Las células microbianas (o microorganismos) usados en la presente invención pueden ser cualquiera de las descritas previamente, en especial en la sección que se refiere a los PUFA y aceites microbianos. Pueden comprender, o ser capaces de producir, un PUFA o aceite microbiano, y adecuadamente el aceite de PUFA puede extraerse o aislarse de las células. Pueden estar en forma filamentosa, como hongos o bacterias, o células individuales como levaduras, algas y bacterias. Las células pueden comprender microorganismos que son 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*. Los hongos preferidos son de las especies *Mortierella alpina*, *Blakeslea trispora* y *Aspergillus terreus*. En lo que se refiere a las levaduras, estas son preferiblemente del género *Pichia* (tal como de la especie *Pichia ciferrii*) o *Saccharomyces*.

65 Las bacterias pueden ser del género *Propionibacterium*.

Si las células son de un alga, esta es preferiblemente un dinoflagelado y/o pertenece al género *Cryptocodinium* o *Daniella*. Las algas preferidas son de la especie *Cryptocodinium cohnii* o *Daniella salina*.

5 Valor de peróxido (POV)

Preferiblemente, el POV del aceite (microbiano) es de 3 a 8 o 12. Sin embargo, pueden obtenerse valores POV inferiores usando el proceso de la invención, y estos valores pueden ser de menos de 10,0 o de menos 8,0. El POV puede medirse usando técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, de acuerdo con AOCS Cd-8-53. La unidad (para POV) es habitualmente mequiv./kg.

Valor de anisidina (AnV)

Este valor puede dar una medida del contenido de aldehído. Preferiblemente, el valor de anisidina del aceite (microbiano) es de 5, 6, 7 o 10 a 15, 20 o 25. Adecuadamente, el AnV es de no más de 20, por ejemplo, de no más de 15. Puede ser de no más de 10 o incluso de no más de 5 o 2. Los valores de AnV (en experimentos preferidos) varían de 5 a 15, óptimamente de 7 a 12. Preferiblemente, el AnV es de 2 o 5 a 12 o 15. El AnV puede medirse usando técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, de acuerdo con AOCS Cd-18-90.

20 Usos de aceites y PUFA

Un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición que comprende el aceite y, cuando sea apropiado, o más sustancias (adicionales). La composición puede ser un producto alimenticio y/o un suplemento alimenticio para animales o seres humanos. Los aceites pueden hacerse adecuados para consumo humano, si fuera necesario, típicamente por refinado o purificación del aceite obtenido de los microbios.

La composición puede ser una fórmula infantil o producto alimenticio (para seres humanos). Aquí, la composición de la fórmula puede ajustarse de manera que tenga una cantidad similar de lípidos o PUFA a la leche materna normal. Esto puede implicar la mezcla del aceite microbiano de la invención con otros aceites para obtener la composición apropiada.

La composición puede ser una composición o suplemento de pienso para animales u organismos marinos. Dichos piensos y suplementos pueden darse a cualquier animal de granja, en particular ovejas, ganado bovino y aves de corral. Además, los piensos o suplementos pueden darse a organismos marinos criados tales como peces y crustáceos. La composición, por tanto, puede incluir una o más sustancias o ingredientes de pienso para dicho animal.

El aceite de la invención puede ser un aceite crudo o refinado. Puede venderse directamente como un aceite y puede estar contenido en envases apropiados, típicamente botellas de aluminio de una pieza recubiertas internamente con laca fenólica epoxi y purgadas con nitrógeno. El aceite puede contener uno o más antioxidantes (por ejemplo, tocoferol, vitamina E, palmitato) cada uno, por ejemplo, a una concentración de 50 a 800 ppm, tal como de 100 a 700 ppm.

Las composiciones adecuadas pueden incluir composiciones farmacéuticas o veterinarias, por ejemplo, a tomarse por vía oral, o composiciones cosméticas. El aceite puede tomarse tal cual, o puede encapsularse, por ejemplo, en una envoltura y, por tanto, puede estar en forma de cápsulas. La envoltura o cápsulas pueden comprender gelatina y/o glicerol. La composición puede contener otros ingredientes, por ejemplo, aromatizantes (por ejemplo, aroma de limón o de lima) o un vehículo o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable.

50 Desespumantes

Durante la desaireación pueden formarse burbujas de gas en el líquido acuoso. Esto puede suceder durante el proceso de desgasificación, según los gases salen de la solución y pueden subir (como burbujas) hacia la superficie del líquido acuoso. Como se espera, esto puede causar que se forme una espuma sobre la parte superior del líquido acuoso. Si no se desea una espuma, se puede reducir o prevenir la formación de espuma por la adición de uno o más desespumantes al líquido acuoso. Dichos desespumantes son conocidos en la técnica y entonces puede utilizarse el desespumante apropiado, por ejemplo, fosfato de tributilo. El desespumante preferiblemente es de naturaleza hidrófoba, y puede ser insoluble en agua. Puede comprender una cadena de hidrocarburo no polar, por ejemplo, modificada por un grupo polar. Los desespumantes preferidos incluyen aceite de silicona, parafina, alcoxilato de alcohol graso y/o un poliglicol.

Los desaireadores químicos preferidos incluyen alcoholes alifáticos, ésteres de ácido graso, etoxilatos de ácido graso, poliéteres de ácido graso y/o alcoholes grasos.

La desaireación puede tener beneficios adicionales, especialmente si las células microbianas tienen que calentarse, por ejemplo, tienen que eliminarse o someterse a pasteurización. Las células, o el líquido acuoso (o cualquier

composición que comprenda las células en la fase apropiada), pueden someterse a altas temperaturas y/o altas presiones durante el calentamiento o la pasteurización. Esto puede causar que los gases abandonen repentinamente o violentamente el líquido acuoso, por ejemplo, puede causar cavitación en las bombas durante la transferencia de células microbianas. Esto es indeseable ya que puede causar alteración de las paredes celulares, en otras palabras, abre las células. Por lo tanto, una etapa de desaireación previa puede reducir los posibles problemas que pueden surgir durante altas temperaturas o presiones, por ejemplo, durante calentamiento o pasteurización.

Equipo (por ejemplo, planta de proceso industrial)

Se describe adicionalmente un aparato adecuado para realizar el proceso de la invención. El aparato puede comprender, por tanto:

- (a) un medio para cultivar (o fermentar) células microbianas (por ejemplo, un fermentador), opcionalmente unido a;
- (b) un medio para desairear un líquido acuoso que comprende las células microbianas; y
- (c) opcionalmente, un medio para obtener un aceite (resultante) de las células microbianas.

En una realización, la desaireación en (b) puede tener lugar mientras las células están (aún) dentro del fermentador. En una alternativa, el medio de desaireación puede ser el medio de desaireación separado (aunque opcionalmente conectado) de (b). Por tanto, las células y el medio de cultivo (por ejemplo, caldo) pueden pasarse o transferirse (por ejemplo, directamente) al medio de desaireación de (b). También puede haber un medio para la pasteurización. Después de la desaireación de (b), el líquido desaireado puede transferirse o pasarse a un medio de pasteurización, o un recipiente en se pasteuriza el líquido (y las células). Cada uno de los medios puede posicionarse en el orden especificado, en el orden de las fases del proceso del primer aspecto.

En un sistema preferido, el líquido acuoso puede transferirse de un fermentador a un sistema de calentamiento (adecuadamente tubular). El líquido acuoso puede (pre)calentarse, lo que en sí mismo puede causar desaireación. El líquido puede calentarse hasta una temperatura de 40 a 80°, tal como de 50 a 70°, tal como de 55 a 65°C. El calentamiento (o fase de precalentamiento), por lo tanto, puede ser parte del sistema de desaireación. La desaireación puede activarse adicionalmente por la adición de agua (la técnica de dilución) y/o vapor (la técnica de remplazo de gas). Cualquiera de estas o ambas pueden suceder antes del (pre)calentamiento.

Después del precalentamiento, por ejemplo, el líquido acuoso puede someterse a una fase de desaireación adicional, por ejemplo, vacío o reducción de presión. El líquido después puede someterse a pasteurización.

Los elementos y características preferidas de un aspecto de la invención son aplicables a otro aspecto *mutatis mutandis*.

La invención se describirá ahora a modo de ejemplo con referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden limitar el alcance.

Ejemplo comparativo 1 y ejemplos 2 a 4 (desaireación dentro del fermentador)

Durante algunos experimentos que implicaban pasteurización de biomasa fúngica (*Mortierella alpina*), se observó algo de oxidación. Se sospechó que la explicación era la presencia del aire en el caldo de fermentación, que provocaba oxidación química, especialmente a altas temperaturas. Aunque las células microbianas necesitan aire para sobrevivir y para biosintetizar los PUFA, se decidió implementar la desaireación del caldo de fermentación dentro del fermentador, antes de la pasteurización (tratamiento de choque térmico).

La fermentación de una biomasa fúngica, *M. alpina*, se realizó como se describe previamente en la técnica. La fermentación se realizó de una manera similar a la descrita en el documento WO 97/36996 (véanse los ejemplos). La fermentación duró aproximadamente 150-200 horas. El caldo se transfirió del fermentador a través de un pequeño recipiente (capacidad de 350 litros) al equipo de pasteurización.

Se realizaron ensayos sobre caldos de fermentación de varias fermentaciones similares con tiempos de fermentación de 150 a 200 horas.

En el primer grupo de experimentos, se realizaron ensayos directamente sobre el caldo mientras estaban aún dentro del fermentador, usando diversos métodos de desaireación, incluyendo detención del burbujeo de aire en el caldo a través del rociador durante 2 horas antes del final de la fermentación (ejemplo 2) y usando nitrógeno para remplazar el aire en el espacio vacío por encima del caldo de fermentación (ejemplos 3 y 4). No se realizaron métodos de desaireación para el ejemplo comparativo 1.

La biomasa seca obtenida de los ensayos de choque térmico se analizó para TPC (recuento total de placas). Los resultados del TPC no se desviaban de los medidos en el caldo pasteurizado en condiciones convencionales. El

- caldo, una vez desaireado y pasteurizado, se usó para aislar un aceite microbiano/de células individuales que contenía ácido araquidónico (ARA). El aceite crudo de ácido araquidónico se recuperó y se analizó. El sistema de recuperación implicaba, después de desairear y pasteurizar el caldo, la adición de cloruro de calcio, la filtración/lavado y exprimido para formar una torta húmeda. Esta torta húmeda después se extruyó para formar un producto de extrusión, que se secó, y la biomasa seca resultante se sometió a extracción.
- Se encontró que aproximadamente un litro de caldo contenía aproximadamente 45 a 55 gramos de biomasa seca, con aproximadamente un 30 a un 35% de aceite.
- Se emplea el siguiente proceso de recuperación a escala de laboratorio. Se realizó la adición de cloruro de calcio usando recipientes de laboratorio de vidrio, con copos de cloruro de calcio y agua. Un 25% p/p de la solución de cloruro de calcio se usó usando $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Se añadieron 24 gramos de solución a un litro de caldo pasteurizado, y se mezclaron bien.
- Se usó filtración para simular la prensa de filtro de membrana. Se usó un filtro de un litro "Seitz", con un paño Sefar Fyltis AM 25116. Se filtró un litro del caldo a 0,5 hasta 1 bar de nitrógeno. Después se despresurizó y se añadieron 0,6 veces el volumen del caldo de agua de lavado añadida, sin alterar la torta durante la adición de agua. La torta entonces se lavó a 0,5 hasta 1 bar y se dejó que la torta se secase por soplado durante aproximadamente un minuto.
- Después se realizó filtración a vacío usando un filtro de cinta de filtración a escala de laboratorio Pannevis usando material de paño Pannevis. Se usaron aproximadamente 400 a 500 ml de caldo se usó, se filtraron hasta una presión de 0,45 bar (-0,55 bar de vacío). Después, se añadieron 0,6 veces el volumen de caldo de agua de lavado y la torta se lavó a una presión de 0,45 bar. La torta entonces se secó por succión.
- La biomasa entonces se exprimió, entre placas, hasta que no pudo retirarse más agua. Esto se hizo usando estopilla.
- Después se realizó la extrusión usando una extrusora picadora de carne (Victoria). Los gránulos resultantes después se secaron usando una secadora de lecho fluido, temperatura de entrada de 50°C, con el ajuste del caudal en "5" durante 30 minutos. La materia seca era entre el 91 y el 96%.
- Entonces se realizó la extracción, extrayéndose 100 gramos de biomasa seca con 500 ml de hexano a temperatura ambiente durante 60 minutos. El hexano se decantó y la torta se lavó con 250 ml de hexano reciente a temperatura ambiente durante 30 minutos. El hexano se decantó y se añadió al hexano previamente extraído. El extracto se aclaró por filtración al vacío usando un filtro de vidrio.
- La evaporación implicó descargar el hexano a granel en el rotavapor con una temperatura del baño de agua de 60 a 70°C a 200 mbar durante 5 a 10 minutos. El hexano restante también se evaporó a la misma temperatura durante 10 a 20 minutos a menos de 100 mbar. Para minimizar la oxidación el sistema se despresurizó usando nitrógeno.
- El aceite resultante que contiene ARA después se analizó para el contenido de POV y AnV como se muestra en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1

Ejemplo n.º	Lote de ferm.	Condiciones del proceso	Condición del proceso de pasteurización		POV [mequiv./kg]	AnV [-]
			[°C]	[s]		
1 (Comp.)	B-03036	• Convencionales*	100	10	16,5	24,3
2	B-03050	• Sin aire en el rociador durante 2 h • Aire en el espacio vacío • 60 rpm	100	10	10,8	10,6
3	B-03050	• 1 hora de N_2 • N_2 en el espacio vacío a 0,6 bar	100	10	9,8	13,2
4	B-03067	• Sin aire en el rociador durante 2 h • N_2 en el rociador durante 2 h • N_2 en el espacio vacío a 0,6 bar • 40 rpm	100	10	8,0	5,5

* El caldo se transfirió mediante una presión de cabeza de 1,8 - 2 bar en el fermentador

Como puede observarse de los datos de la tabla 1, la reducción en la cantidad de aire en el caldo provocó una mejora en el POV y/o AnV. Sobre la base de estos resultados, se creyó que la desaireación podría conseguir una oxidación disminuida, y valores POV y AnV mejorados. Entonces se configuró un ensayo adicional, con un volumen más grande, usando un desaireador separado.

Ejemplos 5 a 14 (desaireador separado)

5 Se instaló un sistema de desaireación permanente, con una "boquilla de tipo paraguas", a una presión de trabajo por debajo de 500 mbar. La transferencia del caldo de fermentación del fermentador al desaireador fue mediante una bomba de bajo corte (bomba monho).

10 El sistema de desaireación, después de la fermentación pero antes de la pasteurización, se instaló usando un sistema de desaireación APV para imitar un desaireador de tipo parasol. El fermentador se unió al desaireador y el caldo se transfirió a una presión de transferencia de 0,5 bar. El desaireador se conectó a una bomba de vacío. Después del paso a través del desaireador, la biomasa se envió (a través de una bomba monho) a un tanque de almacenamiento, antes de enviarla para pasteurización usando un equipo de tratamiento de choque térmico (también APV). La bomba monho tenía un caudal de 10m³/hora y la presión dentro del desaireador era de 400 mbar.

15 La tabla 2 da los resultados del ensayo realizado usando esta configuración de desaireación. El aislamiento del aceite microbiano y el análisis fueron como se describe previamente.

Tabla 2

Ejemplo n.º	Lote de ferm.	Condiciones del proceso	Condiciones del proceso de pasteurización		Presión de desaireación [mbar]	POV [mequiv./kg]	AnV [-]
			[°C]	[s]			
5	B-031096	<ul style="list-style-type: none"> • Sin aire en el rociador durante 1 h • P en el espacio vacío = 0,2 bar • PTF = 0,5 bar 	100	15	400	4,9	13,1
6	B-03102	<ul style="list-style-type: none"> • Sin aire en el rociador durante 1 h • P en el espacio vacío = 0,2 bar • PTF = 0,5 bar 	120	15	400	17,2	36,3
7	B-03102	<ul style="list-style-type: none"> • Sin aire en el rociador durante 1 h • P en el espacio vacío = 0,2 bar • PTF = 0,5 bar 	100	15	400	11,7	19,0
8	B-03104	<ul style="list-style-type: none"> • Sin aire en el rociador durante 1 h • P en el espacio vacío = 0,2 bar • PTF = 0,5 bar 	100	15	400	4,9	7,4
9	A-03079	<ul style="list-style-type: none"> • Sin aire en el rociador durante 1 h • P en el espacio vacío = 0,2 bar • PTF = 0,3 bar (12 m³) • PTF = 0,7 bar (28 m³) 	100	15	400	5,6	9,0
10	A-03081	<ul style="list-style-type: none"> • Sin aire en el rociador durante 1 h • P en el espacio vacío = 0,1 bar • PTF = 0,3 bar (10 m³) • PTF = 0,7 bar (resto del caldo) 	100	15	400	2,9	6,2
11	B-03141	<ul style="list-style-type: none"> • Sin aire en el rociador durante 1 h • P en el espacio vacío = 0,1 bar • PTF = 0,6 bar 	100	15	400	7,6	18,4
12	A-03092	<ul style="list-style-type: none"> • Sin aire en el rociador durante 2 h • P en el espacio vacío = 0,1 bar • PTF = 0,6 bar 	100	15	400	7,8	17,1
13	A-03093	<ul style="list-style-type: none"> • Sin aire en el rociador durante 2 h • P en el espacio vacío = 0,1 bar • PTF = 0,7 bar 	100	15	400	9,3	23,1
14	A-03095	<ul style="list-style-type: none"> • Sin aire en el rociador durante 2 h • P en el espacio vacío = 0,1 bar • PTF = 0,7 bar 	100	15	400	5,2	7,9

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para producir un aceite o un ácido graso poliinsaturado (PUFA), comprendiendo el proceso:
- 5 (a) desairear un líquido acuoso que comprende células microbianas, en el que la desaireación retira al menos parte del oxígeno disuelto y/o no disuelto; y
 (b) obtener el aceite o PUFA de las células,
- 10 en el que el líquido acuoso es un caldo de fermentación y en el que las células se pasteurizan después de la desaireación de (a) pero antes de la fase (b), y en el que el aceite comprende al menos el 10% de ácido araquidónico (ARA) y/o las células son del género *Mortierella*.
2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la pasteurización se realiza calentando las células directamente pasando vapor al fermentador o indirectamente a través de un intercambiador de calor, a través de la pared del fermentador, o con serpentines calentadores, o un intercambiador de calor externo tal como un intercambiador de calor de placa.
- 15 3. Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que comprende adicionalmente:
- (c) extraer, purificar o aislar el aceite o uno o más PUFA.
- 20 4. Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la desaireación comprende:
- a) aplicación de vacío (o presión reducida);
 b) desaireación/desgasificación mecánica (agitación, vibración, uso de fuerza de aceleración o g, tal como en una centrífuga o un ciclón);
 c) cambio de viscosidad (por dilución con agua u otro líquido, o por aumento de la temperatura);
 25 d) una reducción en la columna de aire, la aspersión de aire o el suministro de oxígeno o aire durante la fermentación, o una reducción en la tasa de agitación;
 e) disminución del pH o acidificación;
 f) filtración, por ejemplo, usando un filtro o membrana que comprende preferiblemente un polímero (inerte), por ejemplo, PTFE;
 30 g) desplazamiento de gases, con un gas inerte tal como nitrógeno, un gas noble tal como helio o vapor;
 h) desaireación química, por ejemplo, usando un aceptor de oxígeno, por ejemplo, sulfito sódico o hidrazina;
 i) tiempo, donde se permite que el líquido acuoso repose en condiciones tales que el oxígeno o el aire difunde del líquido;
 o una combinación de uno o más de los métodos de (a) a (i).
- 35 5. Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la desaireación se logra por agitación reducida y/o desplazamiento de gases y, opcionalmente, en el que
- j) el desplazamiento de gases se realiza usando un gas que no comprende oxígeno o comprende oxígeno a un nivel de concentración por debajo del aire atmosférico; y/o
 40 k) el gas es, o comprende, nitrógeno.
6. Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la desaireación comprende someter el líquido acuoso a presión reducida y, opcionalmente, en el que
- 45 l) dicha presión reducida es una presión de no más de 800 mbar absoluta, preferiblemente no más de 600 mbar absoluta; y/o
 m) el líquido acuoso se desairea usando una bomba de vacío o de desgasificación, un desaireador de tipo parasol o una boquilla de tipo paraguas.
7. Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la desaireación produce un contenido de O₂ en el líquido acuoso de menos de 20 ppm, preferiblemente de menos de 10 ppm.
8. Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que las células se pasteurizan a una temperatura por encima de 80°C, preferiblemente por encima de 90°C, preferiblemente por encima de 100°C.
- 55 9. Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el PUFA comprende, o el aceite comprende un PUFA que es, un PUFA C18, C20 o C22 Ω-3 u Ω-6 (opcionalmente ARA, EPA, DHA y/o GLA).
10. Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que las células son células de levadura, bacterianas, fúngicas o de algas.
- 60 11. Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el aceite es un aceite microbiano o de células individuales, y en el que preferiblemente el aceite microbiano comprende al menos un 35% de un PUFA deseado.
- 65 12. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el aceite microbiano comprende al menos un 40% de un PUFA deseado.

13. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en el que el PUFA deseado es ARA.
- 5 14. Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que las células son hongos.
15. Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el PUFA es ARA y en el que las células son *Mortierella alpina*.
- 10 16. Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que (b) comprende obtener un aceite que comprende un PUFA de las células, teniendo dicho aceite un POV de menos de 12 mequiv./kg y/o un AnV de menos de 20.