

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 675 517**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/64** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.01.2001 E 10176023 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.04.2018 EP 2295594**

54 Título: **Proceso de extracción sin solvente**

30 Prioridad:

**19.01.2000 US 177125 P**

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

**11.07.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**RUECKER, CRAIG M.;  
ADU-PEASAH, SWITHIN PATRICK;  
ENGELHARDT, BRIAN S. y  
VEEDER, GEORGE T., III**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 675 517 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 extracción sin solvente

## 5 Campo de la invención

La presente invención apunta a un proceso para extraer, de microorganismos, lípidos que contienen un ácido graso omega-3 u omega-6 altamente insaturado sin utilizar una cantidad significativa de un solvente orgánico apolar.

## 10 Antecedentes de la invención

Un proceso típico de fabricación de lípidos a partir de microorganismos, como la producción de ácidos grasos omega-3 altamente insaturados, en particular, una mezcla lipídica con alto contenido de ácido docosahexaenoico (DHA), implica cultivar microorganismos que sean capaces de producir el lípido deseado en un fermentador, estanque o biorreactor, aislar la biomasa microbiana, secarla y extraer los lípidos intracelulares con un solvente orgánico apolar, por ejemplo, hexano. Generalmente, los lípidos intracelulares de los microorganismos se extraen después de romper (es decir, lisar) las células desecadas de los microorganismos. Los lípidos extraídos se pueden refinar posteriormente para producir lípidos de alta pureza y/o calidad. Los microorganismos se aíslan generalmente diluyendo primero el caldo de fermentación con agua y centrifugando la mezcla para aislar los microorganismos. Luego se secan las células y si los lípidos no se extraen inmediatamente o poco después, las células se empaquetan, por ejemplo, en bolsas selladas al vacío, para evitar la degradación de los lípidos.

Desafortunadamente, el proceso de secado expone los microorganismos al calor, lo que puede dañar, es decir, degradar la calidad de los lípidos si se hace de manera incorrecta. Las bolsas selladas al vacío pueden presentar fugas, que pueden degradar aún más la calidad de los lípidos debido a la exposición de los microorganismos al aire. Además, si los microorganismos desecados no se tratan con un antioxidante, los lípidos se pueden degradar aún más debido a la exposición al aire o a la luz. Por ejemplo, los carotenoides, las xantofilas y los ácidos grasos de cadena larga como el DHA se pueden degradar debido a la oxidación por el aire y/o la luz. Además, en algunos casos, los operadores que se exponen a los microorganismos desecados pueden sufrir una reacción alérgica que crea un peligro para la seguridad y/o la salud de dichos operadores.

Por otra parte, en una producción a escala industrial, la gran cantidad de solvente orgánico apolar volátil e inflamable utilizado en la extracción de los lípidos puede crear condiciones operativas peligrosas. El uso de un solvente orgánico apolar en el proceso de extracción puede requerir el uso de un sistema de recuperación de aceites a prueba de explosiones, lo que aumenta el costo de la recuperación de los lípidos. Además, el uso de un solvente orgánico apolar en la extracción de lípidos de microorganismos genera una corriente de residuos de solvente orgánico apolar que requiere un método de eliminación adecuado, lo que aumenta aún más el costo productivo total de la extracción de los lípidos.

Por lo tanto, existe la necesidad de un procedimiento para extraer lípidos de los microorganismos que no requiera el uso de un solvente orgánico apolar. También existe la necesidad de un proceso de extracción de lípidos de microorganismos que no requiera la costosa etapa de secado de los microorganismos antes de la extracción.

WO9704121 describe un proceso en el que se extrae un aceite de microorganismos que contienen aceite, que comprende desintegrar los microorganismos y ponerlos en contacto, en presencia de un contenido de agua de al menos 70% en peso del originalmente presente en el material celular, con un solvente para el aceite, inmiscible en agua; separar el solvente de los microorganismos y recuperar el aceite del solvente.

## 50 Resumen de la invención

La presente invención proporciona un proceso para obtener lípidos de microorganismos que comprende los pasos de:

- 55 (a) cultivar dichos microorganismos en un medio de cultivo;
- (b) tratar las células de los microorganismos de dicho medio de cultivo sin secar dichas células, donde el tratamiento incluye romper o lisar las células, para liberar los lípidos que están presentes en las mismas;
- (c) someter el medio de cultivo que contiene los lípidos liberados a separación por gravedad para formar una fase ligera que contiene lípidos y una fase pesada;
- (d) separar dicha fase ligera de dicha fase pesada;
- 60 (e) tratar dicha fase ligera para romper una emulsión formada entre dicho lípido y el agua; y
- (f) recuperar un lípido crudo,

donde los lípidos contienen un ácido graso omega-3 u omega-6 altamente insaturado y donde el proceso se realiza sin utilizar un solvente orgánico apolar.

Preferentemente, los microorganismos se cultivan en un medio de fermentación en un fermentador. Alternativamente, los microorganismos se pueden cultivar fotosintéticamente en un fotobiorreactor o estanque. Preferentemente, los microorganismos son microorganismos con gran contenido de lípidos, más preferentemente, los microorganismos se eligen del grupo que consiste en algas, bacterias, hongos y protistas, más preferentemente, los microorganismos se eligen del grupo que consiste en algas doradas, algas verdes, dinoflagelados, levaduras, hongos del género *Mortierella* y Estramenopilos. Preferentemente, los microorganismos comprenden microorganismos del género *Mortierella*, género *Crypthecodinium*, y el orden Thraustochytriales, y más preferentemente, los microorganismos se eligen del género *Thraustochytrium*, *Schizochytrium* o sus mezclas, más preferentemente, los microorganismos se eligen del grupo que consiste en microorganismos que tienen las características identificativas de ATCC número 20888, ATCC número 20889, ATCC número 20890, ATCC número 20891 y ATCC número 20892, cepas de *Mortierella schmuckerii*, cepas de *Crypthecodinium cohnii*, cepas mutantes derivadas de cualquiera de los anteriores y sus mezclas.

El tratamiento de las células incluye un tratamiento para liberar los lípidos mediante lisis, ruptura o permeabilización. Según se usa en este documento, los términos lisar, lisando, lisado, etc., se usarán genéricamente para referirse a un tratamiento para liberar lípidos intercelulares, que incluye romper o permeabilizar las células. Preferentemente, el tratamiento se elige del grupo que consiste en calentar las células, exponer las células a condiciones básicas, exponer las células a un compuesto quelante o combinaciones de los mismos. Más preferentemente, la lisis o ruptura de las células comprende calentar las células a una temperatura de al menos 50 °C mientras se exponen las células a condiciones básicas, a un compuesto quelante o a combinaciones de los mismos.

Preferentemente, la separación por gravedad comprende pasar el caldo de fermentación que contiene los lípidos intercelulares liberados a través de una centrifuga, por ejemplo centrifugas de tipo de discos apilados, separadoras o decantadoras.

La mezcla de células lisadas separadas comprende una capa pesada que consiste en una solución acuosa que contiene los materiales sólidos resultantes de las células lisadas y una capa ligera que contiene los lípidos. Las capas ligera y pesada se pueden separar por centrifugación. Los lípidos pueden estar presentes en estado emulsionado. La capa ligera se puede lavar posteriormente con una solución acuosa de lavado hasta que el lípido se vuelva sustancialmente no emulsionado. Preferentemente, el tratamiento para romper la emulsión comprende mezclar la emulsión con agua, alcohol, acetona o mezclas de los mismos y someter la mezcla a separación por gravedad. El proceso se realiza sin utilizar solventes orgánicos apolares como el hexano.

Cuando el proceso de extracción de lípidos de la presente invención incluye usar microorganismos de un proceso de fermentación, el proceso de extracción también puede incluir solubilizar al menos parte de los compuestos proteicos en un caldo de fermentación mediante la adición de una base elegida del grupo que consiste en hidróxidos, carbonatos, bicarbonatos, fosfatos y sus mezclas.

El proceso de la presente invención también puede incluir calentar los microorganismos a una temperatura de al menos aproximadamente 50 °C. Preferentemente, se agrega un compuesto químico, como una base, al medio de cultivo para ayudar en la lisis de las células.

Como alternativa al calentamiento, las células se pueden lisar con ayuda de un compuesto quelante tal como EDTA. Además de ayudar a lisar o romper las células, los quelantes ayudan a prevenir la oxidación de los lípidos durante el procesamiento, quelando (uniéndose a) iones metálicos productores de radicales libres en el caldo de fermentación como hierro o cobre. Las formas preferidas de los quelantes son las que se consideran de grado alimenticio o GRAS (generalmente reconocidas como seguras). Los compuestos quelantes eficaces incluyen EDTA, ácido cítrico o citrato, ácido láctico, fosfato trisódico, polifosfato, hexametáfosfato, EGTA, DTPA, ácido fítico o CDTA y otras formas salinas de estos compuestos. En una realización, se añade EDTA sódico a las células para degradar las paredes celulares por quelación de los cationes divalentes que ayudan a mantener unidas las paredes celulares. El proceso se puede realizar a temperaturas más altas con menos EDTA o a temperaturas más bajas con mayores concentraciones de EDTA. Por ejemplo, hemos encontrado que las células con gran contenido de DHA de *Schizochytrium* sp. se pueden permeabilizar y/o romper mediante la adición de EDTA a los cultivos al final del proceso de fermentación. Se requiere una concentración de 10 000 ppm para ayudar a romper las células a 30 °C, una concentración de 5000 ppm a 50 °C y a temperaturas superiores a 70 °C son eficaces las concentraciones inferiores a 1000 ppm. Los quelantes se pueden agregar al caldo de fermentación para hacer que las células se rompan más fácilmente mediante procesos físicos como la homogeneización. Además de un quelante, también se puede agregar agua para aumentar la presión osmótica interna con el fin de lisar las células.

Preferentemente, los microorganismos son capaces de multiplicarse a un nivel de salinidad menor de aproximadamente 12 g/L de cloruro de sodio, más preferentemente menor de aproximadamente 5 g/L de cloruro de sodio y muy preferentemente menor de aproximadamente 3 g/L de sodio cloruro. Preferentemente, los microorganismos son capaces de multiplicarse a niveles de salinidad menores de aproximadamente 7 g/L de sodio y

menores de aproximadamente 250 mg/L de cloruro. Preferentemente, el cloruro está presente en una cantidad de aproximadamente 70 a aproximadamente 150 mg/L.

5 Preferentemente, los microorganismos comprenden al menos aproximadamente 20% en peso de lípidos, más preferentemente al menos aproximadamente 30% en peso y muy preferentemente al menos aproximadamente 40%. Alternativamente, al menos aproximadamente 20%, más preferentemente, al menos aproximadamente 20% de los lípidos es colesterol, fitoesteroles, desmosterol, tocotrienoles, tocoferoles, ubiquinonas, carotenoides y xantofilas, tales como betacaroteno, luteína, licopeno, astaxantina, zeaxantina, cantaxantina, y ácidos grasos tales como ácidos linoleicos conjugados y ácidos grasos omega-3 y omega-6 altamente insaturados como ácido eicosapentaenoico, 10 ácido docosapentaenoico y ácido docosahexaenoico, ácido araquidónico, ácido estearidónico, ácido dihomogammalinolénico y ácido gamma-linolénico o sus mezclas, preferentemente al menos aproximadamente 30%, y más preferentemente al menos aproximadamente 40%.

15 En un aspecto particular de la presente invención los microorganismos son capaces de producir al menos aproximadamente 0.1 g por litro por hora de una mezcla de lípidos, que incluye preferentemente colesterol, fitoesteroles, desmosterol, tocotrienoles, tocoferoles, ubiquinonas, carotenoides y xantofilas, como betacaroteno, luteína, licopeno, astaxantina, zeaxantina, cantaxantina, y ácidos grasos tales como ácidos linoleicos conjugados y ácidos grasos omega-3 y omega-6 altamente insaturados tales como ácido eicosapentaenoico, ácido docosapentaenoico y ácido docosahexaenoico, ácido araquidónico, ácido estearidónico, ácido dihomogammalinolénico y ácido gamma-linolénico o sus mezclas, más preferentemente al menos aproximadamente 0.2 g/L/h, aún más preferentemente al menos aproximadamente 0.3 g/L/h y muy preferentemente al menos 0.4 g/L/h.

25 En otro aspecto de la presente invención, el microorganismo se elige del grupo que consiste en algas, hongos, bacterias y protistas. Preferentemente, los microorganismos son del orden Thraustochytriales. Más preferentemente los microorganismos se eligen del género *Thraustochytrium*, *Schizochytrium* y sus mezclas. Y muy preferentemente, los microorganismos se eligen del grupo que consiste en microorganismos que tienen las características identificativa de ATCC número 20888, ATCC número 20889, ATCC número 20890, ATCC número 20891 y ATCC número 20892, cepas mutantes derivadas de cualquiera de los precedentes, y sus mezclas. Preferentemente, los 30 microorganismos se eligen del grupo que consiste en microorganismos que tienen las características identificativas de ATCC número 20888 y ATCC número 20889, y más preferentemente ATCC número 20888, cepas de *Mortierella schmuckeri*, cepas de *Cryptocodium cohnii*, cepas mutantes derivadas de cualquiera de las precedentes, y sus mezclas.

35 Breve descripción de la figura

La figura 1 es un diagrama de flujo de una realización de un proceso de extracción sin solvente de la presente invención.

40 Descripción detallada de la invención

La presente invención apunta a un proceso para extraer, recuperar, aislar u obtener lípidos de microorganismos. El proceso de la presente invención es aplicable a la extracción de lípidos que contienen ácidos grasos omega-3 y omega-6 altamente insaturados tales como ácido eicosapentaenoico, ácido docosapentaenoico y ácido docosahexaenoico, ácido araquidónico, ácido estearidónico, ácido dihomogammalinolénico y ácido gamma-linolénico o sus mezclas, más preferentemente, ácidos grasos omega-3 altamente insaturados, tales como ácido docosahexaenoico (DHA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y/o ácido docosapentaenoico (DPA) (es decir, la forma omega-3 de DPA), en particular lípidos que contienen una cantidad relativamente grande de DHA, de los microorganismos que producen los mismos, y extraer lípidos que contienen ácidos grasos omega-6 altamente insaturados, tales como ácido araquidónico y ácido docosapentaenoico (DPA) (es decir, la forma omega-6 de DPA) de los microorganismos que producen los mismos. Los ejemplos de microorganismos que producen una cantidad relativamente grande de ácidos grasos omega-3 altamente insaturados se dan a conocer en las patentes de Estados Unidos comúnmente asignada N° 5,340,594 y 5,340,742, ambas expedidas a Barclay, y los ejemplos de microorganismos que producen una cantidad relativamente grande de ácido araquidónico se dan a conocer en la 55 patente de Estados Unidos comúnmente asignada N° 5,583,019, expedida a Barclay.

Sin embargo, por razones de brevedad, esta descripción detallada de la invención se presenta, por motivos de conveniencia e ilustración, para el caso de la extracción de lípidos que contienen ácidos grasos omega-3 altamente insaturados de microorganismos que los producen, en particular la extracción de lípidos de microorganismos que producen una cantidad relativamente alta de DHA. Se debe entender, sin embargo, que la invención como un todo no pretende ser tan limitada, y que un experto en el área reconocerá que el concepto de la presente invención será aplicable a otros microorganismos que producen una diversidad de composiciones lipídicas de conformidad con las técnicas tratadas aquí. Estos microorganismos incluyen microorganismos, tales como hongos, protistas, algas y bacterias, que producen una diversidad de lípidos, tales como fosfolípidos; ácidos grasos libres; ésteres de ácidos 60

5 grasos, incluidos los triglicéridos de ácidos grasos. Los lípidos y los compuestos asociados a lípidos incluyen los ácidos grasos omega-3 y omega-6 altamente insaturados tales como ácido eicosapentaenoico, ácido docosapentaenoico y ácido docosahexaenoico, ácido araquidónico, ácido estearidónico, ácido dihomogammalinolénico y ácido gamma-linolénico o sus mezclas. En aras de la brevedad, a menos que se indique lo contrario, el término "lípidos" se refiere a lípidos y/o a compuestos asociados a lípidos.

10 Los procesos de fabricación de lípidos microbianos típicos (en particular, un aceite que contiene un ácido graso omega-3 altamente insaturado como el DHA) implican cultivar microorganismos que producen DHA en un fermentador, aislar los microorganismos, secar la biomasa microbiana y extraer los lípidos intracelulares con un  
 15 solvente orgánico apolar, por ejemplo, hexano. Los lípidos extraídos se pueden refinar generalmente posteriormente para producir lípidos de alta pureza y/o calidad. El aislamiento de los microorganismos implica diluir el caldo de fermentación con agua y centrifugar la mezcla para aislar los microorganismos. Cuando los lípidos no se extraen inmediatamente o poco después de aislar los microorganismos, los microorganismos aislados se secan generalmente, por ejemplo, en una secadora de tambor, y se sellan en un empaque, por ejemplo, en bolsas selladas al vacío, para evitar la degradación de los lípidos. Desafortunadamente, el proceso de secado expone los  
 20 microorganismos al calor, lo que puede dañar, es decir, degradar la calidad de los lípidos si se hace de manera incorrecta. El empaque puede presentar fugas, que pueden degradar aún más la calidad de los lípidos. Además, si los microorganismos desecados no se tratan con un antioxidante, la exposición de los microorganismos al aire y/o la luz puede degradar aún más los lípidos.

La recuperación del aceite crudo directamente del caldo de fermentación evita estos problemas. Evitar el paso de extracción con solvente orgánico apolar reduce los costos de fabricación y también elimina la exposición del operador a los microorganismos desecados, lo que puede producir una respuesta alérgica en algunos individuos.

25 La presente invención proporciona un método para obtener lípidos de microorganismos utilizando un proceso de extracción sin prácticamente solvente orgánico apolar, es decir, un proceso de extracción "sin solvente". Sin embargo, se pueden emplear solventes en etapas posteriores como en un proceso de refinado. El proceso de la presente invención puede incluir obtener o aislar microorganismos, preferentemente de un proceso de fermentación. En contraposición a los métodos actuales los procesos del estado anterior de la técnica tal como la extracción de aceites de los porotos de soja en los que los porotos de soja se deben secar, el proceso de la presente invención no  
 30 requiere un paso de secado previo al proceso de extracción. Por lo tanto, los procesos de la presente invención se pueden aplicar a la extracción de lípidos de una biomasa microbiana que contenga al menos aproximadamente 10% en peso de agua arrastrada, preferentemente al menos aproximadamente 20%, más preferentemente al menos aproximadamente 30% y muy preferentemente al menos aproximadamente 50%. Cuando se obtienen los  
 35 microorganismos de un proceso de fermentación, el proceso de la presente invención puede incluir agregar una base al caldo de fermentación para disolver cualquier compuesto proteico que pueda estar presente en el caldo. Las "bases" son sustancias que tienen reacciones alcalinas (básicas) en soluciones acuosas, es decir se unen a protones y disocian iones hidróxido. La base debe ser suficientemente fuerte para hidrolizar o solubilizar al menos una parte de los compuestos proteicos que puedan estar presentes en el caldo. Las bases que son útiles para solubilizar proteínas son bien conocidas por los expertos en el área química. Los ejemplos de bases que son útiles en los procesos de la presente invención incluyen, pero no exclusivamente, hidróxidos, carbonatos y bicarbonatos de litio, sodio, potasio, calcio y carbonato de magnesio. También se pueden usar otros compuestos muy básicos como sales básicas de fosfato, tal como fosfato trisódico.

45 El proceso de la presente invención incluye romper o lisar las células de los microorganismos para liberar los lípidos que están presentes dentro de las células. Las células se pueden lisar empleando cualquier método conocido incluidos métodos químicos, térmicos, mecánicos, entre otros pero no exclusivamente, prensas francesas, molinos, ultrasonido, homogeneización y explosión de vapor; y sus combinaciones. En una lisis térmica de células, el caldo de fermentación que contiene los microorganismos se calienta hasta que las células, es decir las paredes celulares, de los microorganismos se degradan o se rompen. Habitualmente, el caldo de fermentación se calienta hasta una  
 50 temperatura de al menos aproximadamente 50 °C, preferentemente al menos aproximadamente 75 °C, más preferentemente hasta al menos aproximadamente 100 °C y muy preferentemente hasta al menos aproximadamente 130 °C. Un aspecto importante del proceso es mantener la temperatura por debajo de la temperatura a la cual los lípidos extraídos se pueden degradar. La lisis térmica de las paredes celulares de los microorganismos es particularmente útil para los microorganismos cuyas paredes celulares están compuestas de proteínas. Durante este proceso la cabeza del fermentador se puede llenar con nitrógeno u otro gas inerte para evitar la oxidación de los lípidos por el oxígeno.

60 El calentamiento del caldo también desnaturaliza las proteínas y ayuda a solubilizar los materiales orgánicos, incluidas las proteínas. El paso de calentamiento del caldo de fermentación se puede llevar a cabo por cualquiera de los métodos conocidos, incluido el uso de un intercambiador de calor en línea, y preferentemente haciendo burbujear vapor en el caldo de fermentación y manteniendo el caldo a una temperatura deseada durante menos de aproximadamente 90 minutos, preferentemente menos de aproximadamente 60 minutos y muy preferentemente menos de aproximadamente 30 minutos.

El proceso de extracción sin solvente de la presente invención también puede incluir separar, al menos parcialmente, el caldo de fermentación consumido de los lípidos. Habitualmente, esto se obtiene centrifugando, por ejemplo, pasando el caldo a través de una centrifuga de discos apilados, separadora o decantadora, y recogiendo los lípidos como una fase emulsión. Centrifugar la mezcla da lugar a una mezcla en dos fases que comprende una capa pesada y una capa ligera. Habitualmente, la capa pesada es una fase acuosa que contiene la mayor parte de los residuos celulares. Se da a conocer un proceso en el que la capa ligera que contiene lípidos emulsionados se diluye después con agua, se vuelve a separar en una mezcla en dos fases y la capa ligera se vuelve a aislar. Estos procesos de dilución con agua, separación y aislamiento (es decir, proceso de lavado) se pueden realizar de manera continua introduciendo agua y retirando la capa pesada a lo largo de todo el proceso o se pueden llevar a cabo en pasos discretos. El proceso de lavado se repite generalmente hasta que se obtiene una capa lipídica que prácticamente no está emulsionada, aunque pueden permanecer cantidades menores de emulsión. Se cree que la interfase aceite-agua de la emulsión es estabilizada por los residuos celulares remanentes, que son eliminados mediante el proceso de lavado. Durante el proceso de lavado, la sucesiva cantidad de agua agregada se reduce para aumentar el contenido de lípidos. Si bien reducir demasiado rápidamente la cantidad de agua de alimentación puede provocar la pérdida de lípidos en la fase acuosa, reducir demasiado lentamente la cantidad de agua de alimentación resulta en un proceso de lavado ineficiente. Se puede determinar fácilmente una velocidad adecuada de reducción del agua de alimentación, observando o analizando la capa acuosa separada. Generalmente, la capa lipídica, es decir la capa ligera, está coloreada; por lo tanto, en muchos casos se puede determinar una velocidad adecuada de reducción del agua de alimentación simplemente analizando u observando el color de la capa acuosa que se separa de la capa lipídica.

El proceso de acuerdo con la invención comprende tratar la fase ligera para romper una emulsión formada entre dicho lípido y el agua. Preferentemente, la emulsión se puede romper y el aceite se puede recuperar utilizando el proceso de desaceitado descrito en WO 96/05278. En este proceso, se agrega un compuesto soluble en agua, por ejemplo, alcohol y/o acetona, a la emulsión de aceite/agua para romper la emulsión y la mezcla resultante se separa por centrifugación. El lípido aislado se puede refinar adicionalmente usando un proceso similar al utilizado para refinar aceites vegetales estándar. En resumen, el proceso de refinado de lípidos implica generalmente la hidratación de fosfolípidos mediante adición de ácido fosfórico al lípido, seguido de la adición de hidróxido de sodio para neutralizar los ácidos grasos libres. Estos compuestos se eliminan por centrifugación. Esto es seguido por un paso de lavado con agua para eliminar adicionalmente cualquier cantidad restante de fosfolípidos hidratados ("gomas") y ácidos grasos neutralizados ("pastas de neutralización") del lípido. El lípido resultante se blanquea usando Trysil™ y una arcilla blanqueadora estándar. También se agrega ácido cítrico para eliminar los iones metálicos divalentes por quelación. El Trysil™ y la arcilla blanqueadora se eliminan después mediante filtración para producir lípidos refinados. El lípido blanqueado se puede filtrar en frío para eliminar los compuestos de alto punto de fusión que pueden estar presentes en el lípido; sin embargo, generalmente este paso no es necesario.

El lípido resultante se puede refinar adicionalmente eliminando cualquier componente de bajo peso molecular que pueda estar presente. Habitualmente, estos componentes se eliminan haciendo burbujear vapor a altas temperaturas, en alto vacío. Este proceso también destruye cualquier enlace peróxido que pueda estar presente y reduce o elimina los olores y ayuda a mejorar la estabilidad del aceite. Luego se puede agregar un antioxidante al lípido desodorizado resultante para mejorar la estabilidad del producto.

Durante el proceso de refinado, el lípido aislado se puede frigelizar (winterizar) para eliminar los compuestos de alto punto de fusión, tales como ácidos grasos saturados. El proceso de frigelización implica generalmente disolver el lípido aislado en un solvente orgánico, por ejemplo, hexano, enfriar la solución orgánica resultante y filtrar la solución para eliminar los componentes de alto punto de fusión de la fase lipídica o de estearina. El proceso de frigelización produce generalmente un lípido transparente, especialmente cuando el lípido aislado es turbio u opaco. Como se apreciará, el uso de un solvente como hexano es aceptable en procesos como el proceso de "refinado" descrito antes. Alternativamente, se puede enfriar el lípido aislado y las impurezas solidificadas se pueden separar por filtración, sin emplear un solvente.

El proceso de refinado, blanqueado y desodorizado descrito antes se usaría para mezclas lipídicas con alto contenido de triglicéridos. Alternativamente, o además de este proceso, otros lípidos, por ejemplo, pigmentos o carotenoides, se pueden separar y purificar, por ejemplo, mediante partición en diversos solventes, métodos cromatográficos, etc.

Si bien, el proceso de la presente invención puede incluir aislar microorganismos de un proceso de fermentación, una de las ventajas de la presente invención es que permite que la fermentación de los microorganismos y el aislamiento de los lípidos se lleven a cabo en un único recipiente. Por ejemplo, después de la fermentación, se puede agregar una base al recipiente de fermentación y calentar la mezcla para lisar las células. Después de separar la fase en una capa pesada y una capa ligera, la capa ligera se puede transferir a otro recipiente para su posterior procesamiento o la capa pesada se puede eliminar del recipiente de fermentación, por ejemplo, drenándola por el fondo del recipiente de fermentación, y la capa ligera restante se puede procesar posteriormente dentro del

mismo recipiente de fermentación.

5 Si la concentración de lípidos en las células del cultivo microbiano es alta (por ejemplo, mayor de aproximadamente 20%) pero la concentración de células es baja (por ejemplo, menor de aproximadamente 40 g/l), como en las células cultivadas en sistemas de fermentación continua, o cultivos de células difíciles de multiplicar (por ejemplo, frágiles), o cultivos producidos en sistemas de cultivo basados en fotosíntesis, las células se pueden concentrar, por ejemplo, mediante centrifugación, filtración o sedimentación, antes de emplear los métodos de la invención, si fuera necesario.

10 Otros objetos, ventajas y características novedosas de esta invención se tornarán evidentes para los expertos luego del examen de los ejemplos siguientes de la misma.

**Ejemplos**

15 La reproducibilidad del proceso se caracterizó por la producción de tres muestras de aceite completamente refinado utilizando el nuevo proceso de extracción de aceite crudo sin solvente. Una muestra extraída con hexano también se refinó completamente para servir como control. Los pasos de fermentación, extracción y aislamiento del aceite se realizaron a gran escala, mientras que los estudios de refinado del aceite se realizaron a pequeña escala.

20 Se analizaron las muestras de aceite completamente refinado para demostrar la reproducibilidad del proceso.

Fermentación:

25 Se cultivó un microorganismo con gran contenido de aceite (*Schizochytrium sp.*) en un fermentador de 1200 galones para producir un caldo de fermentación destinado a los procesos de extracción siguientes. Se usó un solo lote para generar el caldo de partida para los tres procesos de extracción sin solvente. Se dejó proceder la fermentación durante 94 horas, mientras se controlaban los niveles de glucosa a 13 g/l, luego de lo cual se concluyó la alimentación de jarabe de maíz. Los niveles residuales de glucosa cayeron a <5 g/l cuatro horas después. Esto dio como resultado una edad final de 98 horas. El volumen del caldo final fue de 958 balones. El rendimiento final fue de 146 g/L en peso seco de las células. Los controles de contaminación en proceso y un análisis exhaustivo de una muestra del caldo final no mostraron ningún signo de contaminación.

Muestra de control extraída con hexano:

35 Se secó en tambor una pequeña alícuota del caldo del lote de fermentación y se extrajo con hexano para actuar como muestra de control. El producto intermedio de la biomasa se recuperó usando una secadora de doble tambor. El análisis de este lípido se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Análisis de la biomasa de *Schizochytrium sp.* secada en tambor.

Parámetro	Valor
Contenido de DHA (en base FAME)	35.7%
Contenido de aceite	62.7%
Valor de peróxido (meq/kg)	2.6
Recuento en placa total (ufc/g)	<50
Contenido de DHA*	20.3%
Contenido de FAME	56.9%
*en base peso celular seco	

40 Proceso de extracción sin solvente:

45 Se obtuvo aceite crudo tratando tres alícuotas de 400 galones (aproximadamente) del caldo de fermentación. Cada alícuota de 400 galones del fermentador se procesó por separado, comenzando con los pasos de tratamiento cáustico/térmico. Cada alícuota se trató con 20 gramos de KOH al 45% por litro y se calentó a 130 °C durante aproximadamente 30 minutos haciendo pasar vapor a través del caldo de fermentación. El aceite crudo se recuperó del caldo tratado utilizando una centrifuga de discos apilados Westfalia HFA-100 a escala comercial. Los resultados del resumen para diversos parámetros del proceso se informan en la Tabla 2 y los resultados finales del análisis del aceite crudo se muestran en la Tabla 3.

50

Tabla 2. Datos del proceso del proceso de extracción sin solvente.

	SFE-1	SFE-2	SFE-3
<b>Tratamiento del caldo</b>			
Volumen de caldo procesado	288 gal	288 gal	258 gal
pH final tratado	7.5	8.0	8.7
Volumen final luego del tratamiento térmico	388 gal	398 gal	308 gal
Aumento de volumen del condensado	34.7%	38.2%	19.4%
<b>1<sup>er</sup> paso emulsión</b>			
Volumen total (gal)	180	133	149
Concentración est. de aceite (p/p)	12.0%	24.5%	16.1%
Densidad aparente (g/mL)	0.986	0.991	0.999
<b>Aislamiento del aceite</b>			
Aceite crudo total recuperado (lb)	182	165	174
Aceite DHA número de lote asignado	SF1A	SF2A	SF3A

Tabla 3. Análisis de los lotes del aceite DHA del proceso de extracción sin solvente.

Parámetro	SF1A	SF2A	SF3A
Contenido de DHA (% de FAME)	39.0%	38.6%	39.2%
Valor de peróxido (meq/kg)	4.6	1.8	2.0
Valor ácido (mg KOH/g)	N/D	N/D	N/D
Contenido de humedad	N/D	N/D	N/D

5

Refinado:

10

15

20

Una muestra de cada alícuota de aceite crudo se frigelizó, refinó, blanqueó y desodorizó a pequeña escala, al igual que una muestra del aceite crudo del control extraído con hexano. Datos misceláneos del proceso de estos experimentos a pequeña escala se muestran en la Tabla 4, que incluyen las eficiencias de recuperación para los diversos pasos del procesamiento. Si bien es difícil inferir demasiado sobre las eficiencias de recuperación para los procesos a escala de laboratorio, dado que las pérdidas tienden a ser desproporcionadamente grandes, los valores indicados en la Tabla 4 muestran que los valores para las muestras extraídas sin solvente tienden a encuadrar los valores medidos para el control extraído con hexano, con la única excepción del paso de frigelización. Si bien la eficiencia de recuperación durante el paso de frigelización para el control extraído con hexano fue menor que las observadas para las otras tres muestras, esta diferencia es insignificante desde una perspectiva estadística. Las altas pérdidas durante el paso de frigelización también hicieron que la eficiencia de recuperación general para la muestra de control extraída con hexano fuera menor. No se espera que el rendimiento más bajo tenga un impacto significativo sobre la calidad general del aceite. En general, las diferencias en el procesamiento de las diversas muestras de aceite fueron mínimas.

Tabla 4. Datos misceláneos del proceso de los pasos de refinado del aceite.

	HEX-1	SF1A	SF2A	SF3A
<b>Condiciones del proceso</b>				
Concentración de miscella	45.0%	52.9%	52.8%	45.0%
Tasa de burbujeo de vapor	3.4%	3.4%	2.5%	2.2%
<b>Eficiencias de recuperación</b>				
Frigelización	80.6%	92.3%	87.7%	85.5%
Refinado	89.4%	84.8%	91.8%	95.0%
Lavado con agua	90.6%	94.5%	95.8%	81.2%
Blanqueado	86.1%	89.2%	87.3%	84.1%

## ES 2 675 517 T3

	HEX-1	SF1A	SF2A	SF3A
<b>Condiciones del proceso</b>				
Desodorización	97.4%	96.1%	97.2%	97.5%
Acondicionamiento	88.2%	89.7%	89.3%	95.8%
<b>Global</b>	<b>48.2%</b>	<b>56.9%</b>	<b>58.5%</b>	<b>51.8%</b>

Se analizaron muestras de aceite completamente refinado de las tres corridas de extracción sin solvente y el control extraído con hexano, y los resultados se muestran en la Tabla 5. También se muestran las especificaciones de liberación correspondientes para cada parámetro.

5 Asimismo se analizó el contenido de hierro de una muestra del aceite crudo de partida de la corrida de extracción sin solvente. El contenido de hierro de esta muestra fue de 0.08 ppm. La concentración de los otros metales traza fue inferior a sus respectivos límites de detección.

10 Tabla 5. Resultados de CC para el aceite DHA de RBD del proceso de extracción sin solvente comparados con el aceite extraído con hexano.

Corrida N° de ID	Hexano	Proceso de extracción sin solvente		
	HEX-1	SFA1	SFA2	SFA3
Valor de peróxido (meq/kg)	0.28	0.69	0.35	0.34
Valor ácido (mg KOH/g)	0.17	0.11	0.57	0.24
Humedad y volátiles	0.00%	0.06%**	0.00%	0.00%
Metales traza (ppm)				
Plomo	<0.20	<0.20	<0.20	<0.20
Arsénico	<0.20	<0.20	<0.20	<0.20
Hierro	0.22	0.21	0.56***	0.02
Cobre	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
Mercurio	<0.20	<0.20	<0.20	<0.20
DHA (% de FAME)	36.9	37.3	37.0	37.7
DHA (mg/g de aceite)	342	345	343	351
Hexano (ppm)	<3	<3	<3	<3

\*El valor se redujo a 0.22 mg KOH/g luego de repetir los pasos de refinado y blanqueado  
 \*\*Muestra analizada por el San Diego Fermentation Sciences Analytical Group.  
 \*\*\* El valor se redujo a <0.02 ppm luego de repetir los pasos de refinado y blanqueado

15 En la tabla 6 se muestra una comparación más directa de los resultados de análisis promedio para las tres muestras del proceso de extracción sin solvente versus los del control extraído con hexano.

Tabla 6. Comparación de los valores promedio

Parámetro	Hexano	Extracción sin solvente			
	Control	Media	Desv. estándar	CV	% de dif.
Valor de peróxido (meq/kg)	0.28	0.46	0.20	43.3%	64.3%
Valor ácido (mg KOH/g)	0.17	0.19*	0.06	33.3%	11.2%
Humedad y volátiles	0.00%	0.02%	0.03%	173%	ND
Metales traza (ppm)					
Plomo	<0.20	<0.20	N/A	N/A	0.0%
Arsénico	<0.20	<0.20	N/A	N/A	0.0%

ES 2 675 517 T3

Parámetro	Hexano	Extracción sin solvente			
	Control	Media	Desv. estándar	CV	% de dif.
Hierro	0.22	0.26	0.27	104%	18.2%
Cobre	<0.05	<0.05	N/A	N/A	0.0%
Mercurio	<0.20	<0.20	N/A	N/A	0.0%
Contenido de DHA (% de FAME)	36.9%	37.3%	0.4%	0.9%	1.1%
Contenido de DHA (mg/g)	342	346	4	1.2%	1.2%
Hexano (ppm)	<3	<3	N/A	N/A	0.0%
*Calculado usando el valor ácido para la muestra vuelta a tratar.					

5 Los resultados de este experimento demuestran claramente que el proceso de extracción sin solvente es reproducible y los lípidos de la extracción sin solvente son relativamente indistinguibles de los lípidos obtenidos del proceso de extracción con hexano, en términos de rendimiento del proceso y calidad del producto. El producto final del proceso de extracción sin solvente es sustancialmente equivalente a los lípidos de un proceso actual de extracción a base de hexano, según se determina por las similitudes entre los perfiles del ácido graso y el esteroles del producto de estos dos procesos.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un proceso para recuperar lípidos de microorganismos que comprende los pasos de:
- (a) cultivar dichos microorganismos en un medio de cultivo;
- (b) tratar las células de los microorganismos de dicho medio de cultivo sin secar dichas células, donde el tratamiento incluye romper o lisar las células, para liberar los lípidos que están presentes en las mismas;
- 10 (c) someter el medio de cultivo que contiene los lípidos liberados a separación por gravedad para formar una fase ligera que contiene lípidos y una fase pesada;
- (d) separar dicha fase ligera de dicha fase pesada;
- (e) tratar dicha fase ligera para romper una emulsión formada entre dicho lípido y el agua; y
- (f) recuperar un lípido crudo,
- 15 donde los lípidos contienen un ácido graso omega-3 u omega-6 altamente insaturado y donde el proceso se realiza sin utilizar un solvente orgánico apolar.
2. El proceso de la reivindicación 1, en el que dichos microorganismos son microorganismos con gran contenido de lípidos.
- 20 3. El proceso de la reivindicación 1 o 2, en el que dichos microorganismos se eligen del grupo que consiste en algas, bacterias, hongos y protistas.
4. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dichos microorganismos se eligen del grupo que consiste en algas doradas, algas verdes, dinoflagelados, levaduras, hongos del género *Mortierella* y Estramenopilos.
- 25 5. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dichos microorganismos comprenden los microorganismos del orden Thraustochytriales.
- 30 6. El proceso de la reivindicación 5, en el que dichos microorganismos se eligen de los géneros *Thraustochytrium*, *Schizochytrium* y sus mezclas.
7. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dichos microorganismos se eligen del grupo que consiste en microorganismos que tienen las características identificativas de ATCC número 20888, ATCC número 20889, ATCC número 20890, ATCC número 20891 y ATCC número 20892, cepas de *Mortierella Schmuckeri*, cepas de *Cryptocodium cohnii*, cepas mutantes derivadas de cualquiera de los precedentes, y sus mezclas.
- 35 8. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que los lípidos contienen un ácido graso omega-3 u omega-6 altamente insaturado elegido entre el ácido eicosapentaenoico, ácido docosapentaenoico, ácido docosahexaenoico, ácido araquidónico, ácido estearidónico, ácido dihomogammalinolénico, ácido gamma-linolénico o sus mezclas.
- 40 9. El proceso de la reivindicación 8, en el que dichos lípidos contienen un ácido graso omega-3 altamente insaturado elegido entre el ácido docosahexaenoico (DHA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y/o ácido docosapentaenoico (DPA).
- 45 10. El proceso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicho ácido graso omega-3 altamente insaturado es DHA.
- 50 11. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho tratamiento de las células incluye un tratamiento elegido del grupo que consiste en calentar dichas células, exponer dichas células a condiciones básicas, exponer dichas células a un compuesto quelante o sus combinaciones.
- 55 12. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicho tratamiento de las células comprende calentar las células hasta una temperatura de al menos 50 °C antes, durante o luego de la exposición de las células a condiciones básicas, a un agente quelante o a mezclas de éstos.
- 60 13. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que dicha separación por gravedad del paso (c) comprende hacer pasar el medio de cultivo que contiene los lípidos liberados a través de una centrífuga de discos apilados, separadora o decantadora.
14. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el tratamiento para romper la emulsión comprende mezclar la emulsión con agua, alcohol y/o acetona y someter la mezcla a separación por gravedad.

**15.** El proceso de la reivindicación 14, en el que dicha separación por gravedad comprende la centrifugación.

**16.** El proceso de la reivindicación 15, en el que dicha centrifugación incluye el tratamiento en una centrífuga de discos apilados, separadora o decantadora.

5 **17.** El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en el que dicho tratamiento se repite al menos 3 veces para obtener dicho lípido crudo.

10 **18.** El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que dicho lípido crudo se somete a un refinado o purificación posterior para obtener un lípido refinado.

**19.** El proceso de la reivindicación 18, en el que dicho lípido crudo se blanquea y desodoriza.

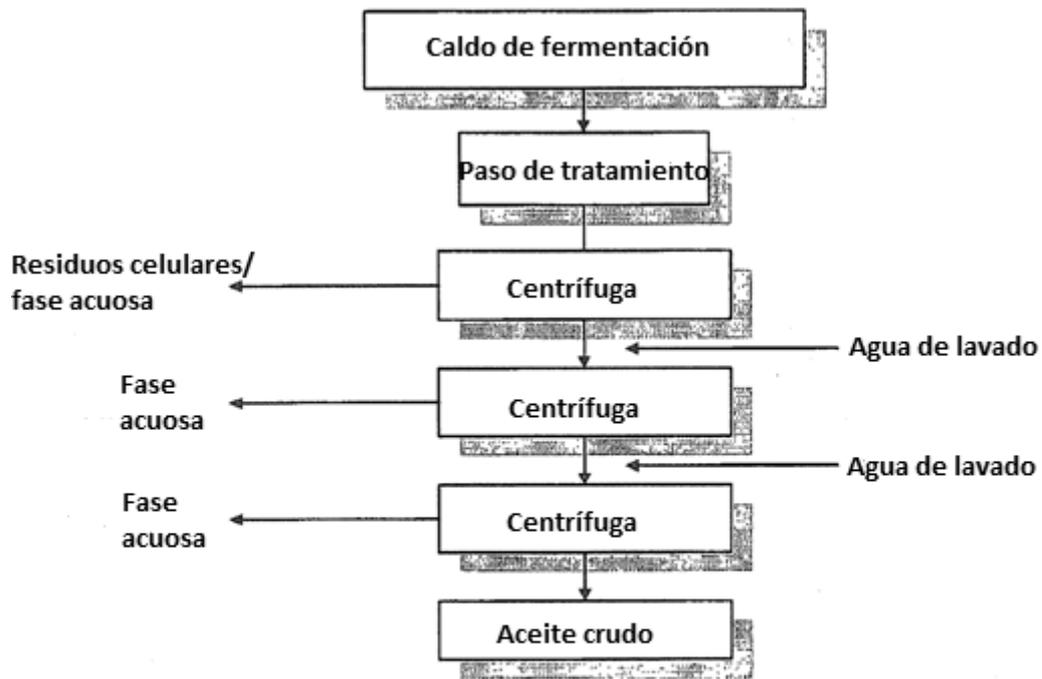


Figura 1