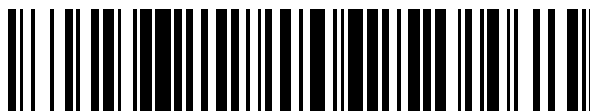


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 712 854**

51 Int. Cl.:

A23D 9/00	(2006.01) A61K 8/99	(2007.01)
A23D 9/02	(2006.01) C12P 7/64	(2006.01)
C12N 1/00	(2006.01) C07C 57/03	(2006.01)
C12N 1/12	(2006.01) C11B 1/10	(2006.01)
C12N 1/14	(2006.01) A23K 20/158	(2006.01)
C12N 1/16	(2006.01) A61L 2/04	(2006.01)
C12N 1/20	(2006.01) A23L 33/115	(2006.01)
A61K 8/67	(2006.01) A23L 33/12	(2006.01)
A61Q 19/00	(2006.01)	
A61K 8/92	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2003** **E 16169170 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018** **EP 3111767**

54 Título: **Aceite microbiano y procedimientos para su procesamiento**

30 Prioridad:

19.06.2002 EP 02254262
18.12.2002 EP 02258713

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.05.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

VERKOEIJEN, DANIEL y
SCHAAP, ALBERT

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 712 854 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

Aceite microbiano y procedimientos para su procesamiento

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un aceite microbiano bruto o sin reinar, que comprende ácido araquidónico (AA).

5 Introducción

Los ácidos grasos poliinsaturados, o AGPI, se encuentran en la naturaleza, y diferentes organismos unicelulares (algas, hongos, etc.) producen una gran variedad de AGPI. Un AGPI particularmente importante es el ácido araquidónico (AA), el cual es uno de tantos ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPI-CL). Químicamente, el ácido araquidónico es el ácido *cis*-5,8,11,14-eicosatetraenoico (20:4), y pertenece a la familia (n-6) de los AGPI-CL.

El ácido araquidónico es un precursor principal de una gran variedad de compuestos biológicos activos, conocidos colectivamente como eicosanoides, un grupo que comprende prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos. El ácido araquidónico también es uno de los componentes de la fracción lipídica de la leche materna humana, y se considera esencial para un desarrollo neurológico óptimo del lactante. El ácido araquidónico tiene una gran variedad de aplicaciones diferentes, incluyendo su uso en preparados para lactantes, productos alimentarios y piensos.

El documento WO-A-97/37032 (Gist-Brocades) se refiere a la preparación de un aceite microbiano, que contiene AGPI, a partir de biomasa pasteurizada. Sin embargo, no se informa de un calentamiento rápido hasta, o un enfriamiento partiendo de, una temperatura a la cual tiene lugar la pasteurización. Además, no se tiene en cuenta la cantidad total de energía empleada durante el proceso de pasteurización.

Tanto el documento WO-A-00/15045 como el WO-A-01/67886 se refieren al uso de hongos *Mucorales* en la preparación de productos alimentarios. El primero de estos documentos se refiere a la necesidad de realizar una reducción de ARN antes de incluir las células en los alimentos, y sugiere utilizar una etapa de calentamiento. Se puede realizar una pasteurización o choque térmico por separado. El segundo documento sugiere que se puede evitar el paso de calentamiento para reducir el contenido de ARN, si se permite que las células fúngicas se conserven en la vasija de fermentación y se dejen "madurar".

La solicitud de patente internacional nº PCT/EP01/08902 se refiere al procedimiento para la preparación de mezclas de aceites mediante la combinación de un aceite bruto que contiene AGPI $\omega 6$ con un aceite bruto que contiene AGPI $\omega 3$, para producir una mezcla de aceites, y posterior purificación de la mezcla de aceites brutos.

Se conocen procedimientos que implican calentar biomasa o células microbianas. También se sabe, desde el documento WO-A-97/37032, que las células microbianas pueden pasteurizarse antes de la extracción de un AGPI de las mismas, en forma de un aceite. Sin embargo, los presentes solicitantes han descubierto un nuevo procedimiento de pasteurización que es capaz de mejorar la calidad del aceite que se puede extraer de las células pasteurizadas. En particular, el aceite resultante puede oxidarse menos, o ser menos oxidado, y puede tener un bajo índice de peróxidos (IP) y/o un bajo índice de anisidina (IAn). Además, los solicitantes han descubierto que este nuevo procedimiento de pasteurización es más eficaz porque requiere menos energía. El procedimiento es, por lo tanto, beneficioso porque no sólo es capaz de mejorar la calidad del aceite, sino que también puede reducir costes, ya que se requiere menos energía.

El documento US-B1-6255505 se refiere a un aceite microbiano que contiene un ácido graso poliinsaturado (AGPI) con un contenido elevado de triglicéridos y una elevada estabilidad oxidativa. Además, se describe un método para la recuperación de tal aceite a partir de una biomasa microbiana derivada de un caldo de fermentación pasteurizado, en el que la biomasa microbiana se somete a extrusión para formar partículas granulares, se seca, y el aceite se extrae entonces de los gránulos secos usando un disolvente apropiado.

El documento EP-A-1178103 se refiere a un procedimiento para preparar una mezcla de aceites de un AGPI $\omega 6$ (tal como AA) con AGPI $\omega 3$ (tal como DHA y/o EPA), que se puede incluir en formulaciones comestibles tales como materias alimentarias, y en particular fórmulas para lactantes. Un aceite bruto que contiene AGPI $\omega 6$ (por ejemplo AA) se mezcla con un aceite bruto que contiene AGPI $\omega 3$ (por ejemplo DHA o EPA) para producir una mezcla (o mezcla) bruta de aceites. Esta mezcla se purifica entonces antes de la adición a una materia alimentaria.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una gráfica de la temperatura (°C) frente al tiempo (minutos) para tres protocolos de pasteurización (A y C pertenecen a la invención, B se proporciona para comparación);

La Figura 2 es una gráfica de la temperatura (°C) frente al tiempo (minutos) para la pasteurización en tres mesetas de temperatura diferentes (40, 70 y 85°C);

Las Figuras 2 y 4 son gráficas del IAn (y del IP para la Fig.3) frente al tiempo (horas);

La Figura 5 es una gráfica del IP (meq/kg) y del IAn frente a la temperatura ($^{\circ}\text{C}$) para la pasteurización a dos tiempos diferentes (permanencia/meseta) (8 y 300 segundos);

5 Las Figuras 6 y 7 son gráficas de la temperatura ($^{\circ}\text{C}$) frente al tiempo (segundos) para dos tiempos diferentes (permanencia/meseta) (8 segundos para la Figura 6, 5 minutos para la Figura 7) a cinco temperaturas diferentes (60, 80, 100, 120 y 140°C).

Descripción de la invención

10 La presente invención proporciona un aceite microbiano bruto o sin refinar que tiene un contenido en triglicéridos de al menos 90% y un índice de peróxidos (IP) menor que 2,5, y que comprende al menos 40% de ácido araquidónico (AA).

15 Un primer aspecto de la presente descripción se refiere a un procedimiento para pasteurizar células microbianas, el cual comprende calentar las células (a una temperatura comprendida) entre 40°C a (60°C o) 70°C en no más de 30 minutos, o calentar las células a una velocidad de al menos $0,5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$. Este aspecto proporciona por lo tanto un calentamiento rápido de las células microbianas durante la pasteurización, y una velocidad tan alta no se ha descrito en la técnica. Mientras que en la técnica se dan temperaturas de pasteurización, no se aprecia ni se discute la velocidad de calentamiento, o que este parámetro pueda ser importante, ni que una velocidad relativamente rápida pueda proporcionar ventajas. De hecho, altas velocidades de calentamiento van en contra de toda lógica, ya que se podría esperar que causasen oxidación, o bien degradación, del AGPI o del aceite que se puede extraer de las células.

20 Un segundo aspecto de la segunda descripción se refiere a un procedimiento para pasteurizar células microbianas, el cual comprende un protocolo de pasteurización que comprende (al menos) tres etapas. Estas son, a saber: una (primera) etapa de calentamiento, una (segunda) etapa de meseta (durante la cual las células microbianas se mantienen a una temperatura deseada, o durante la cual las células se mantienen a una temperatura constante y/o máxima), y una (tercera) etapa de enfriamiento. Este aspecto de la descripción se conoce como el protocolo de pasteurización de tres etapas. Si este protocolo se representa en una gráfica del tiempo frente a la temperatura, se puede obtener un trapecio.

25 Un tercer aspecto de la descripción se refiere a un procedimiento para pasteurizar células microbianas, el cual comprende utilizar un protocolo de pasteurización tal que el área bajo la gráfica del tiempo (minutos) frente a la temperatura ($^{\circ}\text{C}$) sea menor de $13\,000^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}$. El área bajo la gráfica del tiempo frente a la temperatura proporciona la cantidad de energía consumida para calentar las células durante el procedimiento de pasteurización. Se ha descubierto que un calentamiento rápido y/o enfriamiento rápido (que se corresponden, respectivamente, con la primera y la tercera etapa del segundo aspecto) pueden proporcionar ventajas, tales como un aceite de mejor calidad. Además, la cantidad de energía requerida para el procedimiento de pasteurización se puede reducir en comparación con los procedimientos de pasteurización descritos en la técnica. Este tercer aspecto, por lo tanto, concierne al aporte energético requerido para el procedimiento de pasteurización.

30 Un cuarto aspecto de la descripción se refiere a un procedimiento para pasteurizar células microbianas, el cual comprende (calentar las células, y de esta manera) mantener las células a una temperatura elevada (T , $^{\circ}\text{C}$) durante un tiempo (t , minutos), por ejemplo en una etapa de meseta, en la cual el producto $t\cdot T$ (es decir, la multiplicación del parámetro del tiempo por el de la temperatura, por ejemplo durante la etapa de meseta) es de 140 a $100\,800^{\circ}\text{C}\cdot\text{minuto}$. Como se notará, este cuarto aspecto es similar al segundo aspecto, por cuanto contiene una etapa de meseta. Las células se pueden mantener en esta etapa a una temperatura constante o máxima. El producto $t\cdot T$ puede, por lo tanto, representar el área bajo la gráfica del tiempo frente a la temperatura para esta etapa de meseta.

Primer aspecto — Calentamiento rápido

45 En este aspecto, las células se calientan de manera que la temperatura de las células pasa de 40°C a 70°C (o 60°C) en no más de 30 minutos (tal como en no más de 15 minutos). Preferiblemente, el tiempo transcurrido para pasar de 40 a 70°C no tarda más de 40 o 50 minutos. Como alternativa, o además, las células se calientan a una velocidad de al menos $0,5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$. Por supuesto, las células microbianas pueden partir de (o calentarse desde) una temperatura menor de 40°C . Por ejemplo, las células pueden estar a temperatura del entorno o temperatura ambiente. Las células pueden estar a la temperatura de fermentación, tal como $30^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$. De este modo, cuando comienza el calentamiento, las células pueden estar a una temperatura de 20 a 40°C , tal como de 23 a 27°C (o de 25 o 29 a 32 o 37°C). En algunos casos, las células microbianas se pueden haber enfriado, por ejemplo después de que haya terminado la fermentación. De este modo, cuando comienza el calentamiento, las células pueden tener una temperatura (inicial) de 5 a 10°C , tal como de 7 a 9°C .

Las células microbianas se pueden calentar de forma que su temperatura aumente por encima de (60 o) 70°C. De este modo, puede que ésta no sea la temperatura final de las células microbianas durante la pasteurización. De hecho, las células pueden calentarse a una temperatura mayor que (60 o) 70°C. La temperatura puede aumentar hasta que se alcance una temperatura de 70 a 90, 110 o 130°C, tal como de 75 a 87°C, y de forma óptima de 78 a 84°C. La temperatura máxima durante la pasteurización puede, por lo tanto, entrar dentro de estos intervalos, pero para algunas realizaciones puede alcanzar hasta 100, 120 o 140°C. Preferentemente, las células se conservan o mantienen a esa temperatura (máxima).

De lo cual se deducirá que las células se pueden calentar a una temperatura menor que, o que parte de, 40°C, hasta una temperatura mayor o igual a 70°C. El intervalo de 40 a 70°C puede producir un "clic" que extienda el calentamiento/intervalo de temperatura para el cual se puede especificar (y por lo tanto calcular) un tiempo (y por lo tanto una velocidad).

Se calculará que la velocidad del calentamiento rápido (de 40 a 70°C en 30 minutos) es de 1°C/minuto. Sin embargo, si es necesario, la velocidad puede ser ligeramente menor que ésta, y en el primer aspecto, el calentamiento rápido supone una velocidad de calentamiento mayor de 0,5°C/minuto. Preferentemente, la velocidad es de al menos 0,6, 1,0 o incluso 1,5°C/minuto. Sin embargo, se contemplan velocidades de calentamiento particularmente rápidas, dependiendo del equipo y del volumen o del peso de las células microbianas a calentar. De este modo, la descripción incluye velocidades de calentamiento de más de 2,0 o incluso 2,5°C/minuto.

Se pueden obtener velocidades de calentamiento particularmente altas utilizando un equipo especializado. Éste puede alcanzar una temperatura alta en un periodo corto de tiempo, y, al hacerlo, esto puede minimizar cualquier oxidación o deterioro del AGPI o aceite microbiano que puede ser aislado posteriormente. De este modo, el calentamiento puede tener lugar hasta una temperatura máxima de hasta 140, 150 o 160°C. Preferiblemente, el calentamiento puede alcanzar un intervalo de temperatura de 100 a 180°C, tal como de 120 a 160°C, preferiblemente de 130 a 150°C. Al emplear calentadores particularmente rápidos, estas temperaturas se pueden alcanzar de forma particularmente rápida, por ejemplo en un tiempo menor que un minuto (30 segundos). Tales temperaturas se pueden alcanzar en 20, 30, 40 o 50 segundos, o pueden tardar hasta 150, 175, 200, 225 o 250 segundos. Sin embargo, tales temperaturas se pueden alcanzar en tan sólo 2, 4, 6, 8 o 10 segundos, por ejemplo si se está utilizando un calentador de infusión, o con muestras relativamente pequeñas. De este modo, se pueden alcanzar velocidades de calentamiento de hasta 50, 100, 150 o incluso 200°C por minuto. De este modo, son posibles velocidades de calentamiento algo menores, de 5 o 10 a 50 o 60°C por minuto, tales como de 15 a 45°C por minuto.

Se ha descubierto que este rápido calentamiento durante una rápida pasteurización no sólo es más eficaz, y requiere menos energía, sino que parece que es al menos un factor responsable de la obtención de un aceite microbiano de mejor calidad (una vez extraído de las células tras la pasteurización).

Segundo aspecto — Protocolo de pasteurización en tres etapas

La primera etapa puede ser una etapa de calentamiento. Ésta, de hecho, corresponde al calentamiento rápido descrito en el primer aspecto de la descripción, y, por lo tanto, todas las peculiaridades y características del primer aspecto se aplican a la primera etapa (de calentamiento) del segundo aspecto *mutatis mutandis*.

La segunda etapa corresponde a cuando las células están en una meseta (de temperatura). Las células pueden, de este modo, conservarse a una temperatura particular deseada (más o menos 1 o 2, 5 o incluso 10°C) durante el tiempo deseado. Las células pueden, de este modo, mantenerse a una temperatura constante. Preferiblemente, esta temperatura (o intervalo de temperaturas), en la etapa de meseta, es la temperatura máxima alcanzada durante el protocolo de pasteurización. La temperatura en la etapa de meseta (y/o la temperatura máxima durante la pasteurización) es, preferiblemente, de al menos 70°C. Puede ser menor que 90 o 100°C, convenientemente de 70 a 85°C, tal como de 70 a 77°C. Como alternativa, puede ser de 80-160°C, tal como de 100-140°C.

La duración de la etapa de meseta, o el tiempo que las células se mantienen a la temperatura deseada o máxima, puede ser de 5 segundos a 90 minutos, tal como de 1 o 10 a 80 minutos, por ejemplo de 20 a 70 minutos. De forma óptima, este tiempo es de 40 o 50 a 60 o 70 minutos, tal como de 45 a 65 minutos, y convenientemente de 55 a 63 minutos. También son posibles tiempos particularmente cortos, por ejemplo de 8 segundos a 5 minutos.

La tercera etapa es una etapa de enfriamiento. Preferiblemente, las células se enfrían a una temperatura que es igual a, o entra dentro de, los intervalos mencionados para el inicio del calentamiento (o primera etapa). Preferiblemente, las células microbianas se enfrían y/o calientan linealmente (en la primera y/o tercera etapa, según proceda), es decir, cuando se representa en una gráfica del tiempo frente a la temperatura, el perfil de enfriamiento o calentamiento toma la forma de (aproximadamente) una línea recta. Las células se pueden dejar enfriar, o se pueden enfriar de forma activa, por ejemplo utilizando un intercambiador de calor y/o una sustancia refrigerante, por ejemplo (bajando) a temperatura en condiciones normales o a temperatura ambiente, o una temperatura menor.

Preferiblemente, la velocidad de enfriamiento es de al menos 0,4, 0,6, 1,0 o 1,5°C/minuto. Estos valores representan velocidades de enfriamiento alcanzables cuando las células se dejan enfriar. Sin embargo, son posibles velocidades de enfriamiento más rápidas, especialmente si se emplea un enfriamiento activo. De este modo, se pueden alcanzar velocidades de enfriamiento de al menos 2,0, 2,5, 3,0 o incluso 3,5°C/minuto. Sin embargo, son posibles velocidades de enfriamiento mayores, tales como mayores que 5°C por minuto, por ejemplo de 7 o 10 a 50 o 60°C por minuto, preferiblemente de 15 a 45°C por minuto.

La velocidad de calentamiento y/o enfriamiento preferida se mantiene preferiblemente durante al menos 10, 20 o 30°C, aunque en algunas realizaciones esto puede conseguirse durante al menos un intervalo de 40 o 50°C.

Se observará que con una etapa rápida de calentamiento y con una etapa rápida de enfriamiento, la cantidad de energía empleada para la pasteurización se puede reducir. Esto no sólo puede dar lugar a un ahorro en los costes, sino que puede que no afecte negativamente a la calidad del aceite microbiano (final); de hecho, parece tener efectos beneficiosos sobre el aceite.

Tercer aspecto — Área bajo la gráfica del tiempo frente a la temperatura (aporte energético)

Se observará del segundo aspecto, que si el protocolo de pasteurización de la descripción se representa en una gráfica del tiempo frente a la temperatura, se obtiene una forma de trapecio. La primera etapa (de calentamiento) y la tercera etapa (de enfriamiento) pueden tener cada una forma triangular, mientras que la intermedia o segunda etapa (de meseta) (el objeto del cuarto aspecto) es (normalmente) rectangular. El área bajo la gráfica del tiempo frente a la temperatura representa la cantidad de energía aportada al sistema. Al dividir el protocolo de pasteurización en tres partes, se puede calcular el área de la gráfica, y por consiguiente, el aporte energético.

En el tercer aspecto, el área bajo la gráfica del tiempo (en minutos) frente a la temperatura (en °C) es menor que 13.000°C/minuto. Sin embargo, se han conseguido cantidades mucho menores que ésta, y son posibles valores menores que 11.000, 10.000, 9.000, 8.000 o incluso 1.000°C/minuto. En aspectos preferidos de esta descripción, estos valores no pueden ser mayores que 7.000, 6.000 u 800°C/minuto. En la gráfica a la cual se hace referencia, el tiempo se representa en el eje x (o eje horizontal o de abscisas), y 0°C representa el origen. La temperatura se representará, de este modo, en el eje y (o eje vertical o de ordenadas), y 0°C representa el origen.

Una vez que las células microbianas han sido calentadas hasta su temperatura de pasteurización, entonces pueden enfriarse (o son enfriadas). Las células normalmente se enfrían a temperatura en condiciones normales o ambiente, o al menos a una temperatura menor que 30°C. Por lo tanto, existe un tiempo, no sólo para que las células se calienten de 30°C a 60°C, sino que también existe un tiempo para que las células se enfríen de 60°C a 30°C. Se pueden sumar estos dos tiempos para obtener un tiempo combinado de calentamiento y enfriamiento de 30-60 a 30°C. Preferiblemente, este conjunto es únicamente menor que 150 minutos, tal como menor que 120 o 100 minutos. Sin embargo, con muestras más pequeñas, se pueden conseguir tiempos mucho más rápidos, y el tiempo combinado (de 30 a 60, y vuelta a 30°C) puede ser menor que 70, 50 o incluso 30 minutos.

Cuarto aspecto — Protocolo de pasteurización con etapa de meseta

Este protocolo puede ser un protocolo conforme al segundo aspecto, en el cual existen una (por ejemplo, primera) etapa de calentamiento, y una (por ejemplo, segunda) etapa de enfriamiento y, entre medias, una etapa (por ejemplo, segunda, media o intermedia) de meseta. Sin embargo, esto no es esencial, y se pueden considerar otros protocolos de pasteurización. El cuarto aspecto se refiere a las peculiaridades preferidas de esta etapa de meseta. Todas las peculiaridades y características del segundo (y de otros) aspectos se aplican a este cuarto aspecto *mutatis mutandis*.

Las células se mantienen o se conservan a una temperatura deseada particular (más o menos 1, 2, 5 o incluso 10°C) para una temperatura T (°C) durante un tiempo t (minutos). Estos dos parámetros se pueden multiplicar entre sí para dar el producto t.T. Éste es convenientemente de 140 o 280 a 50.000 o 100.800°C/minuto. Preferiblemente, este producto es de 500, 1.000, 2.000 o 3.000, o incluso 6.000 hasta 10.000, 18.000 o 25.000°C/minuto. De forma óptima, el producto t.T es de 2.000 a 6.000, tal como de 3.000 a 5.000, y de forma óptima de 4.000 a 4.500°C/minuto. En algunas realizaciones, el producto t.T es de 13 a 900, tal como de 100 o 200 a 700 o 800, y de forma óptima de 300 a 400 a 600 o 700°C/minuto.

De este modo, de una forma similar al tercer aspecto, se notará que el producto t.T representa el área bajo la gráfica del tiempo frente a la temperatura para las células, cuando se mantienen a la temperatura elevada. De este modo, el factor de multiplicación t.T es, efectivamente, el área bajo la gráfica para la etapa de meseta únicamente (sin incluir el calentamiento ni el enfriamiento).

Extracción de un AGPI

Un quinto aspecto de la presente descripción se refiere a un procedimiento para obtener un AGPI a partir de células microbianas, el cual comprende pasteurizar las células conforme a cualquiera del primer, segundo, tercero o cuarto

aspectos de la descripción, como se describieron anteriormente, y extraer y/o aislar de las células pasteurizadas un AGPI.

- 5 Como se explica, la presente invención se refiere a un aceite microbiano bruto o sin refinar, que tiene un contenido de triglicéridos de al menos el 90% y un índice de peróxidos (IP) menor que 2,5, y que comprende al menos 40% de ácido araquidónico (AA). El aceite puede tener un IP menor que 2,5, 1,5, 0,8, 0,6, o incluso 0,5, y/o un IAn menor que 1,0. El aceite se prepara mediante el procedimiento del quinto aspecto.

Ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) y aceites microbianos

- 10 El AA se puede obtener mediante las células pasteurizadas en el procedimiento de la descripción, tales como una célula microbiana. Puede tratarse de una célula de bacteria, alga, hongo o levadura. La fuente de AA preferida es la *Mortierella alpina*, *Blakeslea trispora*, *Aspergillus terreus* o *Pythium insidiosum*. El aceite microbiano puede ser un líquido (a temperatura ambiente).

- 15 Se prefiere que la mayor parte del AGPI esté en forma de triglicéridos. De estos triglicéridos, preferiblemente al menos 40%, tal como al menos 50%, y de forma óptima al menos 60% del AGPI está presente en la posición α del glicerol (presente en la cadena principal de los triglicéridos), también conocida como la posición 1 o 3. Se prefiere que al menos 20%, tal como al menos 30%, de forma óptima al menos 40% del AGPI esté en la posición β (2).

- 20 El aceite microbiano comprende al menos 40 o 45% de ácido araquidónico, y tiene un contenido de triglicéridos de al menos 90%. Preferiblemente, el aceite microbiano tiene un contenido de triglicéridos de 90 a 100%, tal como al menos 96%, preferiblemente al menos 98%, más preferiblemente al menos 99%, y de forma óptima más de 99,5%. Típicamente, el aceite microbiano tendrá un contenido de ácido eicosapentenoico (EPA) menor que 5%, preferiblemente menor que 1%, y más preferiblemente menor que 0,5%. El aceite puede tener menos de 5%, menos de 2%, menos de 1% de cada ácido graso poliinsaturado (AGPI) C₂₀, C_{20:3}, C_{22:0} y/o C_{24:0}. El contenido de ácidos grasos libres (AGL) puede ser $\leq 0,4$, 0,2 o 0,1. El aceite puede tener un poco o nada de AGL y/o ADGL.

El aceite microbiano puede ser un aceite bruto. Puede haber sido extraído de las células utilizando un disolvente, tal como dióxido de carbono supercrítico, hexano o isopropanol.

- 25 Procedimiento de pasteurización

- 30 La pasteurización tendrá lugar, en general, una vez haya terminado la fermentación. En una realización preferida, la pasteurización dará fin a la fermentación, ya que durante la pasteurización el calor matará a las células. Por lo tanto, la pasteurización se puede realizar sobre el caldo de fermentación (o las células en el medio líquido (acuoso)), aunque se puede realizar sobre la biomasa microbiana obtenida del caldo. En el primer caso, la pasteurización se puede llevar a cabo mientras las células microbianas están aún dentro del fermentador. La pasteurización, preferiblemente tiene lugar antes de cualquier procesamiento adicional de las células microbianas, por ejemplo desmenuzado en forma de gránulos (por ejemplo, por extrusión) o amasado.

Preferiblemente, el protocolo de pasteurización es suficiente para inhibir o inactivar una o más enzimas que pueden afectar negativamente o degradar un AGPI o aceite microbiano, por ejemplo una lipasa.

- 35 Una vez haya terminado la fermentación, el caldo de fermentación se puede filtrar, o tratar de otro modo para eliminar agua o líquidos acuosos. Tras la eliminación del agua, se puede obtener una "torta" de biomasa. Si la pasteurización no ha tenido lugar, las células deshidratadas (o torta de biomasa) se puede someter a la pasteurización.

Procedimiento de extracción de AGPI

- 40 El AGPI (o aceite microbiano, que normalmente comprende el AGPI) puede entonces extraerse de las células microbianas (pasteurizadas). Preferiblemente, se extrae de gránulos (por ejemplo, secos) (por ejemplo, extrusados) que contienen las células. La extracción se puede llevar a cabo utilizando un disolvente. Preferiblemente, se utiliza un disolvente apolar, por ejemplo un alcano de C₁₋₈, preferiblemente de C₂₋₆, por ejemplo hexano. Se puede utilizar dióxido de carbono (en forma líquida, por ejemplo en estado supercrítico).

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

- 50 El disolvente permite obtener un aceite bruto que contiene AGPI. Este aceite se puede utilizar en ese estado, sin procesamiento adicional, o puede someterse a una o más etapas de refinado. Sin embargo, un aceite bruto es normalmente aquél 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 ha sido sometido a una (preferiblemente a ninguna) de las siguientes etapas de refinado. En la solicitud de patente internacional nº PCT/EP01/08902 se describen protocolos de refinado adecuados. Por ejemplo, el aceite se puede someter a una o más etapas de refinado, que

pueden incluir tratamiento con ácido o desgomado, tratamiento alcalino o eliminación de ácidos grasos libres, decoloración o eliminación de pigmentos, filtración, invernación (o enfriamiento, por ejemplo para eliminar triglicéridos saturados), desodorización (o eliminación de ácidos grasos libres) y/o pulido (o eliminación de sustancias insolubles en aceite). Todas estas etapas de refinado se describen con más detalle en el documento PCT/EP01/08902, y se pueden aplicar a las etapas descritas en la presente solicitud *mutatis mutandis*.

El aceite resultante es particularmente adecuado para fines nutricionales, y puede añadirse a alimentos (para humanos) o a productos alimentarios (para animales). Los ejemplos incluyen leche, preparados para lactantes, bebidas saludables, pan y piensos.

Células microbianas

Las células microbianas (o microorganismos) que se utilizan en la presente invención pueden ser cualquiera de las descritas anteriormente, especialmente en la sección referente a los AGPI y aceites microbianos. Pueden comprender, o ser capaces de producir, un AGPI o aceite microbiano, y convenientemente el aceite que contiene AGPI puede extraerse o aislarse de las células. Pueden estar en forma de filamentos, como hongos o bacterias, o como células individuales, como levaduras, algas y bacterias. Las células pueden comprender microorganismos que son levaduras, hongos, bacterias o algas. Se prefieren los hongos del orden de *Mucorales*, por ejemplo los hongos pueden ser del género *Mortierella*, *Phycomyces*, *Blakeslea* o *Aspergillus*. Se prefieren los hongos de las especies *Mortierella alpina*, *Blakeslea trispora* y *Aspergillus terreus*.

Calentamiento

Se puede llevar a cabo por calentamiento (de las células) directo o indirecto. El calentamiento, si es directo, puede hacerse haciendo pasar vapor al fermentador. Un método indirecto puede utilizar intercambiadores de calor, bien a través de la pared del fermentador, o con serpentines calentadores, o con un intercambiador de calor externo, tal como un intercambiador de calor de placas.

Normalmente, la pasteurización tendrá lugar en la vasija de fermentación en la cual se ha realizado la fermentación. Sin embargo, para algunos organismos (tales como bacterias), a menudo se prefiere eliminar antes las células de la vasija, y después pasteurizar. La pasteurización puede tener lugar antes de otro procesamiento de los organismos, por ejemplo secado o granulación.

La pasteurización normalmente matará a la mayoría de, si no a todos, los microorganismos. Tras la pasteurización, al menos 95%, 96 o incluso 98% de los microorganismos han sido eliminados, es decir, no están vivos.

Acidificación

En algunos casos es deseable reducir el riesgo de crecimiento de las células pasteurizadas. Una posibilidad es acidificar las células con un ácido adecuado. De este modo, para prevenir el crecimiento de las especies microbianas, puede ser deseable ajustar el pH de las células a un intervalo de 3 a 4. Sin embargo, se pueden emplear intervalos de pH más amplios, dependiendo de las células, y así el pH se puede ajustar de 2 a 5, de forma óptima a un intervalo de aproximadamente 3,3 a 3,7.

La acidificación de las células puede tener lugar antes de la pasteurización. Sin embargo, se realiza preferiblemente después.

El pH se puede ajustar por cualquier medio conveniente, o con cualquier ácido adecuado. Preferiblemente, esto se consigue utilizando ácido fosfórico, tal como al 85%, o diluido al 55%, o ácido fosfórico al 33%.

Índice de peróxidos (IP)

Preferiblemente, el IP del aceite microbiano es menor que 2,5. Sin embargo, el IP puede ser no mayor que 2,0. Sin embargo, se pueden obtener valores de IP mucho más bajos utilizando el procedimiento de la descripción, y estos valores pueden ser menores que 1,5 o menores que 1,0. Se pueden obtener valores de IP menores que 0,8 o 0,6, e incluso menores que 0,4. Los valores (de las realizaciones) oscilaron entre 1,3 (o 0,8) y 0,4. La unidad (de IP) es generalmente meq/kg.

Índice de anisidina (IAN)

Este valor puede dar una medida del contenido de aldehídos. Preferiblemente, el índice de anisidina del aceite microbiano es de 5, 6, 7 o 10 a 15, 20 o 25, especialmente para un aceite bruto. Convenientemente, el IAN es menor que 20, por ejemplo, menor que 15. Puede ser no mayor que 10 o incluso no mayor que 5. Preferiblemente, los valores del IP y/o del IAN hacen referencia a un aceite bruto en lugar de uno refinado. Los valores de IAN (en los experimentos preferidos) oscilaron entre 15 a 5, opcionalmente entre 12 a 7.

Aceites brutos frente a refinados

A continuación se presentan algunas diferencias entre estos dos aceites. Cada aceite bruto o refinado puede tener una o más de las características en la siguiente Tabla para el aceite bruto o refinado, según sea oportuno. Un aceite bruto contendrá normalmente un antioxidante (por ejemplo, tocoferol, palmitato de ascorbilo).

Sustancia	Preferido (para el bruto)	Aceite bruto	Aceite refinado
Insaponificables	≤3,5% (p/p)	2,5% (p/p)	1,8 (p/p)
Disolvente (por ejemplo, hexano)	<2000 ppm	100-2000 ppm	Indetectable o ≤ 1 ppm
Fosfolípidos %		2-3,5	0,05
Ácidos grasos libres, como oleico	<1%	0,2%	0,08%
IP	≤10 meq/kg	6 meq/kg	1,4 meq/kg
Insolubles	<0,5%	0,1%	—
Fósforo	<1000 mg/kg	5 mg/kg	—
Silicio	<500 ppm	100 ppm	24 ppm
Arsénico	<0,5 mg/kg	<0,04 mg/kg	<0,5 mg/kg
Cadmio	<0,2 mg/kg	<0,02 mg/kg	<0,1 mg/kg
Mercurio	<0,04 mg/kg	<0,4 mg/kg	<0,04 mg/kg
Plomo	<0,1 mg/kg	<0,1 mg/kg	<0,1 mg/kg
Cobre	<0,2 mg/kg	<0,2 mg/kg	<0,02 mg/kg
Humedad y volátiles	<1,0%	0,5	<0,02%
Fosfátido (P/ppm)		50-100	<10

5

Convenientemente, el aceite bruto en la presente invención puede tener una o más de las siguientes características:

(a) un contenido de insaponificables de 2,0 a 3,5% (p/p);

(b) un contenido de disolvente (por ejemplo, hexano) de 10, 50 o 100 ppm hasta 1000, 1500 o 2000 ppm;

(c) un contenido de ácidos grasos libres de 0,1 o 0,2% a 1%, por ejemplo 0,2-0,6 o 0,3-0,5%;

10 (d) un contenido de fósforo de al menos 2, 3 o 5 mg/kg;

(e) un contenido de silicio de 50 o 100 ppm a 500 ppm; y/o un contenido de agua menor que 1%, o de 0,5 a 1 o 2%.

Usos de aceites y AGPI

15 Un sexto aspecto de la descripción se refiere a una composición que comprende el aceite del quinto aspecto, y, cuando sea oportuno, una o más sustancias (adicionales). La composición puede ser un producto alimentario, y/o un suplemento alimentario para animales o seres humanos. En realizaciones de la invención que son para consumo humano, los aceites pueden resultar adecuados para el consumo humano, típicamente mediante el refinado o la purificación del aceite obtenido de los microorganismos.

20 La composición puede ser un preparado para lactantes o un producto alimentario (para seres humanos). La composición del preparado se puede ajustar de forma que tenga una cantidad similar de lípidos o AGPI a la leche materna natural. Esto puede implicar mezclar el aceite microbiano de la invención con otros aceites para conseguir la composición adecuada.

La composición puede ser una composición de piensos o un suplemento para animales o para especies marinas. Dichos piensos y suplementos se pueden suministrar a cualquier animal de una explotación agraria, en particular a ganado ovino, bovino y avícola. Además, los piensos o suplementos se pueden suministrar a organismos marinos criados en piscifactorías, tales como peces y mariscos. La composición puede, de este modo, incluir una o más sustancias o ingredientes alimentarios para tales animales.

El aceite de la invención puede venderse directamente como un aceite contenido en un envase apropiado, típicamente botellas de aluminio de una pieza recubiertas internamente con una laca epoxifenólica, y purgado 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 100 a 700 ppm.

Se pueden incluir en las composiciones adecuadas composiciones farmacéuticas o veterinarias, por ejemplo para administración oral, o composiciones cosméticas. El aceite puede tomarse como tal, o puede encapsularse, por ejemplo con una cubierta, y de este modo puede estar en forma de cápsulas. La cubierta o las cápsulas pueden contener gelatina y/o glicerol. La composición puede contener otros ingredientes, por ejemplo saborizantes (por ejemplo, sabor a limón o lima), o un vehículo o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable.

Las peculiaridades o 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, los cuales se proporcionan a modo de ilustración, y no con la intención de limitar el alcance.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Se cree que la actividad enzimática causa la oxidación durante la producción de un aceite microbiano que contiene AGPI. Se consideró la pasteurización como un método para estabilizar la oxidación durante el procesamiento de células microbianas para obtener el aceite microbiano. Se descubrió que el grado de estabilización era dependiente de las condiciones de pasteurización.

Por lo tanto, se llevaron a cabo varios experimentos para determinar qué condiciones de pasteurización podrían afectar el nivel de oxidación, y en particular el índice de peróxidos (IP) del aceite. Los índices de peróxidos se determinaron utilizando el protocolo estándar detallado en AOCS: Cd8-53.

Los experimentos siguen el siguiente protocolo: fermentación; conservación; pasteurización; extracción (del aceite microbiano); y análisis del aceite.

El hongo *Mortierella alpina* se cultivó en un fermentador. La fermentación duró aproximadamente 148 horas. El *M. alpina* produjo el AGPI llamado ácido araquidónico (AA). La biomasa se eliminó del fermentador, y se conservó (a una temperatura menor que -18°C).

Las muestras de la biomasa de *M. alpina* se eliminaron del caldo de fermentación, mientras éste se encontraba aún dentro del fermentador, y se congelaron inmediatamente.

Se evaluaron varios protocolos de pasteurización. La pasteurización se llevó a cabo a tres temperaturas diferentes, a saber: 40, 70 y 85°C. El protocolo siguió un procedimiento de tres etapas, con una primera etapa de calentamiento rápido, seguida de una meseta (una segunda etapa o etapa intermedia) a la temperatura deseada, que fue la temperatura máxima utilizada. Después, hubo una (tercera) etapa de enfriamiento rápido. Se sometieron diferentes muestras de la biomasa a una etapa (de meseta) intermedia con tres tiempos diferentes, a saber: una, dos y 24 horas.

Tras la pasteurización, el aceite microbiano se obtuvo utilizando una técnica de extracción por vía húmeda. Esta muestra de la biomasa se filtró, se prensó (a presión) y se extrajo el aceite.

El aceite microbiano se analizó posteriormente, fundamentalmente para obtener el índice de peróxidos (IP) utilizando un método de la AOCS. Se determinó el contenido de AA para algunas de las muestras. Los análisis mostraron que el aceite microbiano obtenido contenía aproximadamente 420 g de AA por kg.

Protocolo detallado: fermentación y extracción de muestras

Se recogió un litro del caldo de fermentación de la vasija de fermentación y se filtró (filtro Seitz de dos litros, F-FA10). La torta resultante se lavó entonces con 600 ml de agua desmineralizada. La torta húmeda se secó durante un minuto con una corriente de aire caliente, y se prensó (utilizando un aparato HAFICOTM, prensa de tintura, C-OAO21, 300-400 atm) a 400 bares. El extrusado húmedo se utilizó después para extraer un aceite microbiano con 500 ml de hexano (Merck) a temperatura ambiente (20 a 25°C) durante una hora utilizando una máquina Ultra-

TurraxTM. Entonces, el hexano se decantó. La torta restante se lavó entonces con 250 ml de hexano reciente (con agitación, durante 30 minutos) a temperatura ambiente. El hexano se decantó, y se añadió después al hexano extraído previamente.

- 5 Posteriormente, el extracto se filtró utilizando un filtro de vidrio combinado con un filtro de vidrio GFA. Después, el hexano se evaporó del extracto transparente, utilizando una máquina RotavaporTM, a aproximadamente 50°C durante unos 15 minutos. El aceite se transfirió después a copas herméticas, y cada copa de la muestra se purgó entonces con nitrógeno durante 30 segundos. Después, la copa de la muestra se cerró y se almacenó a -18°C.

Protocolos de pasteurización

- 10 Se evaluaron tres protocolos diferentes (A, B y C). Cada uno se componía de tres etapas, una primera etapa de calentamiento, una segunda etapa de meseta (a una temperatura máxima), y una tercera etapa de enfriamiento. La Tabla 1 muestra, a continuación, los protocolos para los tres perfiles de pasteurización.

Tabla 1

	Tiempo (t, min)	Temp. (T, °C) para el tiempo (t)	Etapas	Cambio de temp. en la etapa (°C)	Tiempo por etapa (min)	Área bajo el perfil (°C.min)	Velocidad de calentamiento/enfriamiento (°C/min)	Tiempo para pasar de 40 a 70°C (min)	Tiempos combinados de 40-70-40°C (min)	Área bajo la gráfica T frente a T (°C.min)
Perfil A	0	25								
	75	70	Calentar	45	tcalent=75	1687,5	0,6	50		7575
	135	70	Pasteurizar	0	tpast=60	4200	0			
	210	25	Enfriar	45	tenfri=75	1687,5	0,6	50	100	
Perfil B (no entra en la descripción, para comparar)	0	25								
	102	72	Calentar	48	tcalent=102	4896	0,46	65,11		13968
	162	72	Pasteurizar	0	tpast=60	4320	0			
	360	28	Enfriar	48	tenfri=198	4752	0,22	135	200,11	
Perfil C	0	7								
	25	70	Calentar	63	tcalent=25	787,5	2,52	11,90		5607,5
	85	70	Pasteurizar	0	tpast=60	4200	0			
	105	8	Enfriar	62	tenfri=20	620	3,10	9,68	21,58	

Los tres perfiles de pasteurización A, B y C se muestran adicionalmente de forma gráfica en la Figura 1. Como se puede notar, el área bajo la gráfica de la temperatura (T, °C) frente al tiempo (t, minutos) se puede calcular para cada una de las tres etapas en cada perfil, y después se pueden sumar para dar el área total bajo la gráfica para cada uno de los tres perfiles. Estos cálculos se muestran adicionalmente en la Tabla 1 anterior.

5 El índice de peróxidos (IP) se determinó para los aceites que resultan de la extracción de las células, siguiendo los tres protocolos de pasteurización A, B y C. El IP para los aceites extraídos fue 8,7, 14,3 y 2,4, respectivamente. El perfil B tuvo velocidades de calentamiento y de enfriamiento lentas, y se presenta únicamente para comparación. Éste dio el IP más alto, de 14,3.

10 Por el contrario, tanto el perfil A como el C están dentro de la invención. El perfil A tiene una velocidad de calentamiento y una velocidad de enfriamiento más rápidas en la primera y la tercera etapa que el perfil B. Preferiblemente, en la invención, las velocidades de calentamiento y de enfriamiento son al menos tan rápidas como las que se muestran en el perfil A. El perfil A dio un IP de 8,7.

15 Sin embargo, los mejores resultados se obtuvieron utilizando el perfil C, el cual tuvo un IP de sólo 2,4. Como se puede observar a la vista de la Figura 1, éste tuvo una etapa de calentamiento muy rápida, y una (tercera) etapa de enfriamiento rápida.

Ejemplo 2

20 Se realizaron experimentos similares a los del Ejemplo 1, excepto que esta vez la temperatura de pasteurización se varió mucho más, a saber: a 40°C (para comparación), 70°C y 85°C. El perfil de la temperatura (°C) frente al tiempo (minutos) se muestra en la Figura 2 y en la Tabla 2 a continuación. El perfil fue esencialmente el mismo para todas las muestras, pero por supuesto, con una prolongación de la meseta de pasteurización (desde una hora hasta 4 o 24 horas) según corresponda.

Tabla 2

40°C		70°C		85°C	
Tiempo	Temperatura	Tiempo	Temperatura	Tiempo	Temperatura
0	10,0	0	8,0	0	7,0
10	27,0	10	55,0	10	40,0
20	40,1	17	70,0	20	66,0
25	40,0	77	68,2	30	79,0
40	41,4	82	44,3	40	83,5
50	41,0	87	31,3	100	79,8
80	38,7	92	21,8	105	55,3
85	27,5	97	16,0	110	38,7
90	19,3	102	9,7	115	26,3
95	14,5			120	21,0
100	9,7			125	15,2
110	7,5			130	11,3

25 Se analizaron muestras de dos fermentaciones distintas (ambas de *M. alpina*) de diferente duración. Muestras del nº 11 al 20. La Tabla 3 tuvo una fermentación que duró un poco más, en la que aproximadamente 2 m³ del caldo se transfirieron a un fermentador para inóculos, y la fermentación se prolongó durante 48 horas sin añadir más glucosa.

30 Tras la pasteurización, las muestras se procesaron, empezando por la filtración a una presión de aproximadamente 1 bar de nitrógeno. La torta resultante se lavó después con agua de procedimiento (aproximadamente 0,6 del volumen inicial del caldo). La deshidratación se llevó a cabo utilizando una prensa para fruta, ejerciendo una presión sobre el pistón de 300 a 400 bares. Posteriormente, se añadieron 500 ml de hexano reciente, y se mezcló durante un minuto utilizando una máquina Ultra-Turrax. Después, la extracción tuvo lugar durante aproximadamente una hora a

temperatura ambiente. Tras la filtración, la torta resultante se lavó con 250 ml de hexano reciente, y el disolvente resultante se evaporó a vacío a 60 a 70°C. Se purgó después con nitrógeno y se almacenó a -18°C.

Los resultados se muestran en la Tabla 3, la cual incluye el primer y el segundo índice de peróxidos medido, y la media de estos dos valores, así como el índice de anisidina (IAn). La disminución del IP y del IAn se muestran también en las Figuras 3 y 4 (para las fermentaciones de menor y de mayor duración, respectivamente).

Tabla 3

Muestra nº	T _{past} (°C)	t _{past} (h)	IP1	IP2	IP _{media}	IAn
1	—	0	6,0	5,4	5,7	25,7
2	40	1	8,8	8,5	8,6	25,9
3	40	4	3,8	3,8	3,8	27,1
4	40	24	2,1	2,2	2,1	21,0
5	70	1	2,2		2,2	30,2
6	70	3,5	1,1	1,1	1,1	33,5
7	70	22	0,7	0,7	1,0	15,9
8	85	1	1,2	1,2	1,2	25,9
9	85	3,3	0,7	0,8	0,7	27,1
10	85	20,5	0,5	0,5	0,5	12,9
11	—	0	5,9	5,4	5,6	39,3
12	40	1	9,9	10,1	10,0	38,7
13	40	4	4,8	4,5	4,6	40,7
14	40	24	2,5	3,0	2,8	32,3
15	70	1	2,7	2,8	2,7	40,3
16	70	3,5	1,6	1,7	1,3	32,7
17	70	22	1,0	0,9	1,3	14,5
18	85	1	1,8	1,8	1,8	39,7
19	85	3,3	1,1	1,1	1,1	32,4
20	85	20,5	0,9	1,0	0,9	16,1

Se podrá observar a la vista de los resultados que, sin pasteurización, el IP fue 5,6 o 5,7. La pasteurización a 40°C disminuyó el IP, pero se requirió un tiempo relativamente largo (tal como 24 horas) a la temperatura de pasteurización para disminuir el IP hasta un valor aceptable de 2,1.

Se obtuvieron mejores resultados para temperaturas más altas. Por ejemplo, la pasteurización durante sólo 1 hora a 70°C dio un IP de 2,2, comparado con un IP de 2,1 durante 24 horas a 40°C. Incluso se obtuvieron mejores valores a temperaturas más altas, obteniendo un valor de IP de sólo 1,2 a 85°C durante 1 hora. (Estas cifras se refieren a la fermentación de menor duración, aunque se pueden obtener resultados similares con células cultivadas durante la fermentación de mayor duración).

De este modo, las Figuras 3 y 4 muestran gráficamente cómo varían los valores de IP y de IAn con respecto a diferentes tiempos de pasteurización. Como cabía esperar, tiempos de pasteurización más largos dan menores valores de IP y de IAn. Sin embargo, tiene mayor importancia el uso de temperaturas relativamente altas durante la pasteurización. Cuando se aumentó la temperatura de pasteurización (T_{past}) hasta 70°C, se observó una marcada disminución del IAn y

del IP, y se dieron valores aún menores a 85°C. (Las tres líneas superiores, representadas por cruces, círculos rellenos y asteriscos, muestran los valores de IAn, mientras que las tres líneas inferiores, representadas por diamantes, cuadrados y triángulos, dan los valores de IP).

- 5 La Tabla 4 muestra a continuación el producto calculado $t.T$ (en °C.minuto) para los nueve protocolos de pasteurización diferentes (para tres temperaturas de meseta diferentes y para tres tiempos diferentes). De hecho, este producto representa el área bajo la gráfica (del tiempo, t , minutos, frente a la temperatura, T , °C) para la etapa de meseta (después de la etapa de calentamiento, pero antes de la etapa de enfriamiento).

Tabla 4

	Temp. (T, °C)			
		40	70	85
Tiempo (t, h/min)				
1 (60)		2.400	4.200	5.100
4 (240)		9.600	16.800	20.400
24 (1440)		57.600	100.800	122.400

10 Ejemplo 3

Se realizaron más análisis de pasteurización utilizando el caldo de fermentación, obtenido tras la fermentación a escala de producción, utilizando el hongo *M. alpina*, como se utilizó previamente de ejemplo. El caldo sin pasteurizar (800 litros) se transportó y se almacenó a 4°C. El caldo se transfirió después a una vasija de 700 litros agitada, y se llevaron a cabo 10 protocolos de pasteurización diferentes.

- 15 En primer lugar, la pasteurización se llevó a cabo a cinco temperaturas (máximas) diferentes, a saber: 140, 120, 100, 80 y 60°C, con un tiempo de permanencia (meseta) de 8 segundos (a temperatura máxima). En segundo lugar, la pasteurización se llevó a cabo a 140, 120, 100, 80 y 60°C, con un tiempo de permanencia (meseta) de 300 segundos a temperatura máxima.

- 20 Se tomaron muestras (2 litros) y entonces se congelaron directamente a -18°C. Se tomaron muestras estériles (200 ml) y se congelaron, y se recuperó de las muestras un aceite bruto que contenía AA, utilizando el siguiente protocolo.

- 25 Se filtró una muestra del caldo de fermentación (1,7 litros) a 1 bar de N_2 . La torta se lavó con 0,6 volúmenes de agua condensada, y se comprimió durante aproximadamente 5 minutos a 400 kg/cm². Posteriormente, se añadió n-hexano (500 ml) al residuo húmedo, y se granuló utilizando una máquina Ultra-Turrax a 24.000 rpm. El aceite se extrajo a temperatura ambiente (aproximadamente 21°C) durante unos 110 minutos. La suspensión se filtró a vacío utilizando un medio de filtro GF/A Whatman. La torta se lavó con 250 ml de hexano reciente. El hexano se evaporó durante 15 minutos en un baño de agua a una temperatura de aproximadamente 60 a 70°C. El aceite resultante se transfirió después a copas herméticas de muestras, las cuales se purgaron con nitrógeno durante 30 segundos, después se cerraron y se conservaron a -18°C antes del análisis.

- 30 Las Figuras 5, 6 y 7 proporcionan los datos tras el análisis. Las Figuras 6 y 7 muestran los perfiles del tiempo frente a la temperatura para los dos conjuntos de experimentos, en primer lugar del tiempo de meseta (permanencia) de 8 segundos, y en segundo lugar para el tiempo de meseta (permanencia) de 5 minutos, para cada una de las 5 condiciones de temperatura, respectivamente. Como se observa a la vista de las gráficas, la línea horizontal intermedia (que representa 8 segundos o 5 minutos) muestra la etapa de meseta.

- 35 La Figura 5 muestra los valores resultantes del IP y del IAn para los 10 regímenes de pasteurización. Como se puede observar, se obtuvieron menores valores de IP con temperaturas cada vez mayores, y el mayor tiempo de residencia (5 minutos) dio el valor de IP más bajo.

REIVINDICACIONES

1. Un aceite microbiano bruto o sin refinar, que tiene un contenido en triglicéridos de al menos 90% y un índice de peróxidos (IP) menor que 2,5, y que comprende al menos 40% de ácido araquidónico (AA).
2. Un aceite microbiano bruto o sin refinar de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene un IP menor que 1,5.
- 5 3. Un procedimiento que comprende someter al aceite de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 a una o más etapas de refinado, que incluyen preferiblemente el tratamiento con ácido o desgomado, tratamiento alcalino o eliminación de ácidos grasos libres, filtración, invernación, desodorización y/o pulido.
4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende añadir el aceite resultante a alimentos para seres humanos o a productos alimentarios para animales.
- 10 5. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, que comprende añadir el aceite resultante a preparados para lactantes.

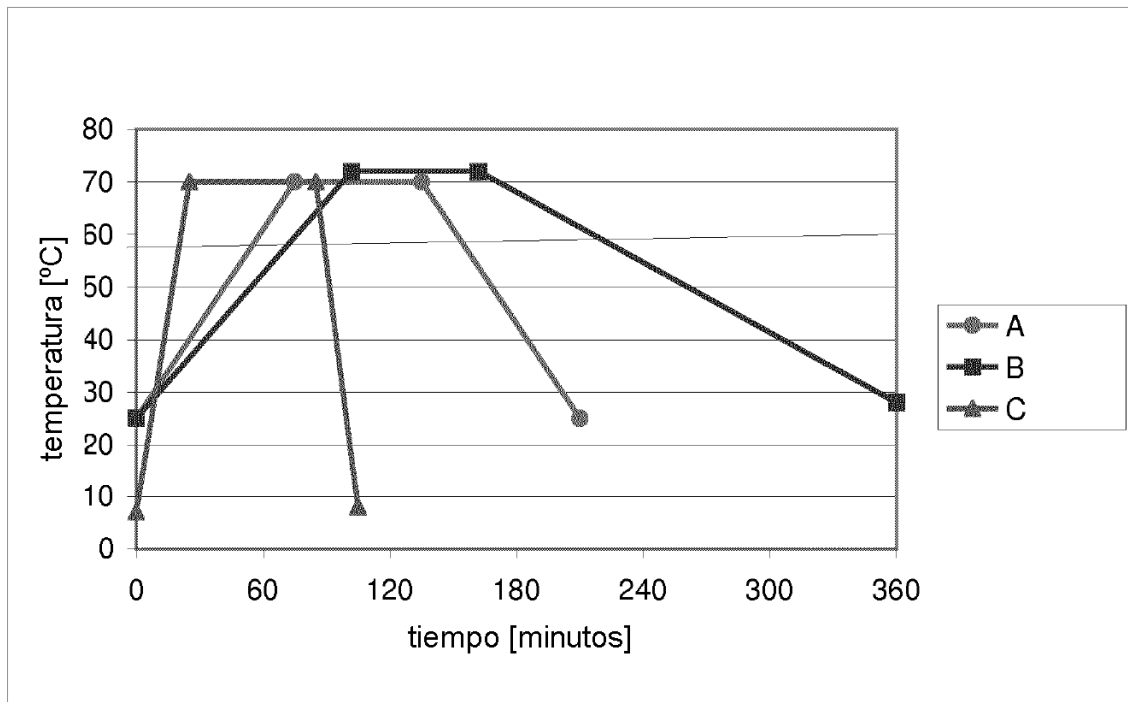


Figura 1

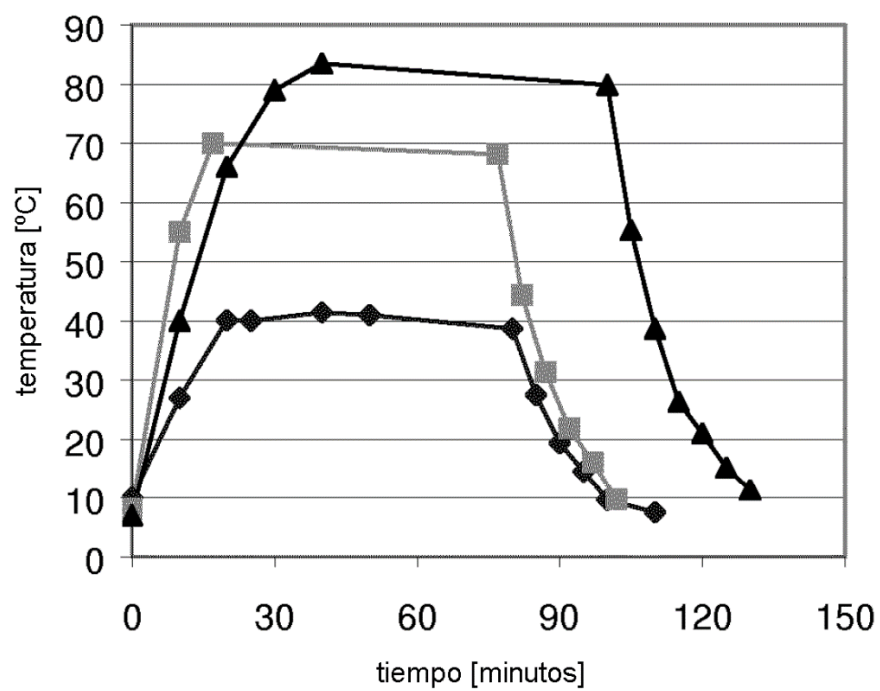


Figura 2

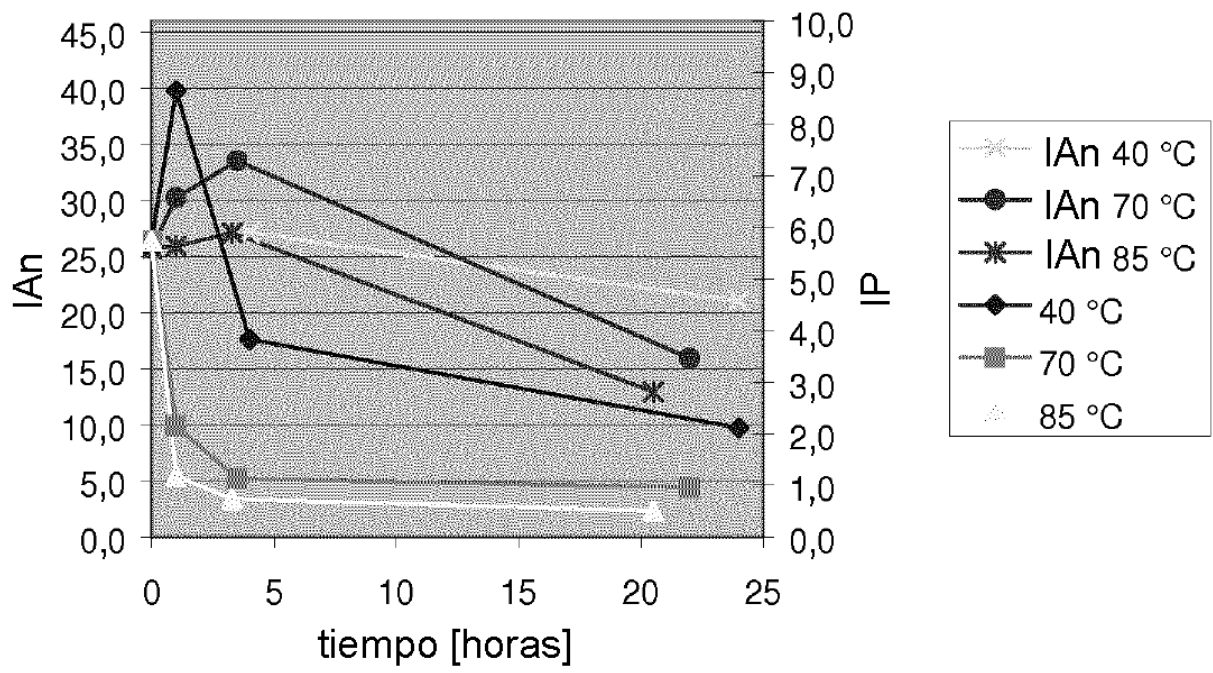


Figura 3

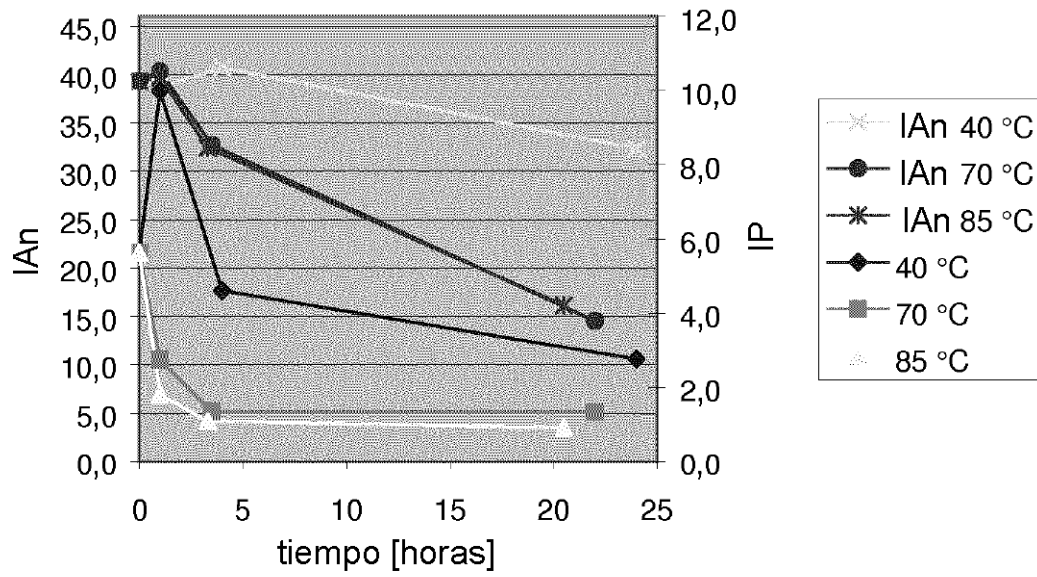


Figura 4

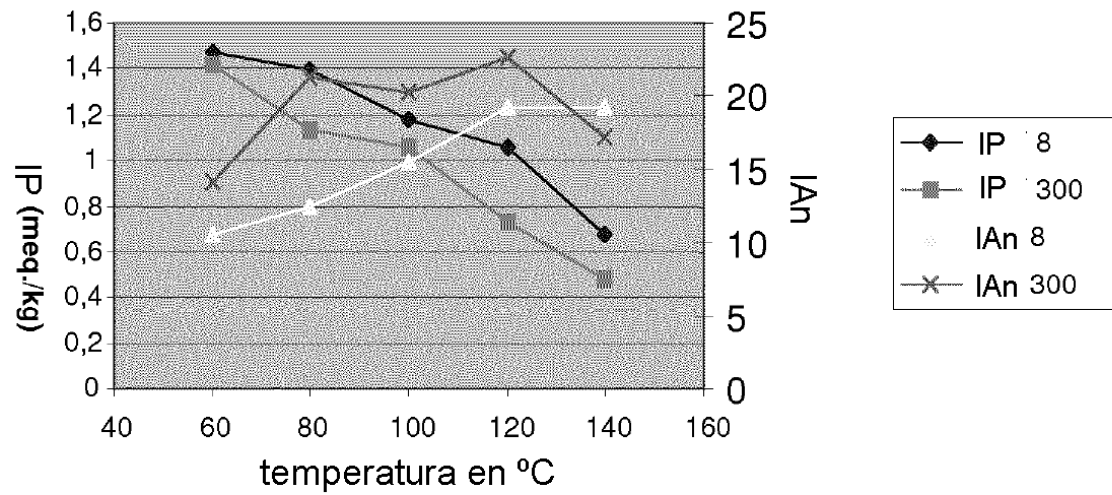


Figura 5

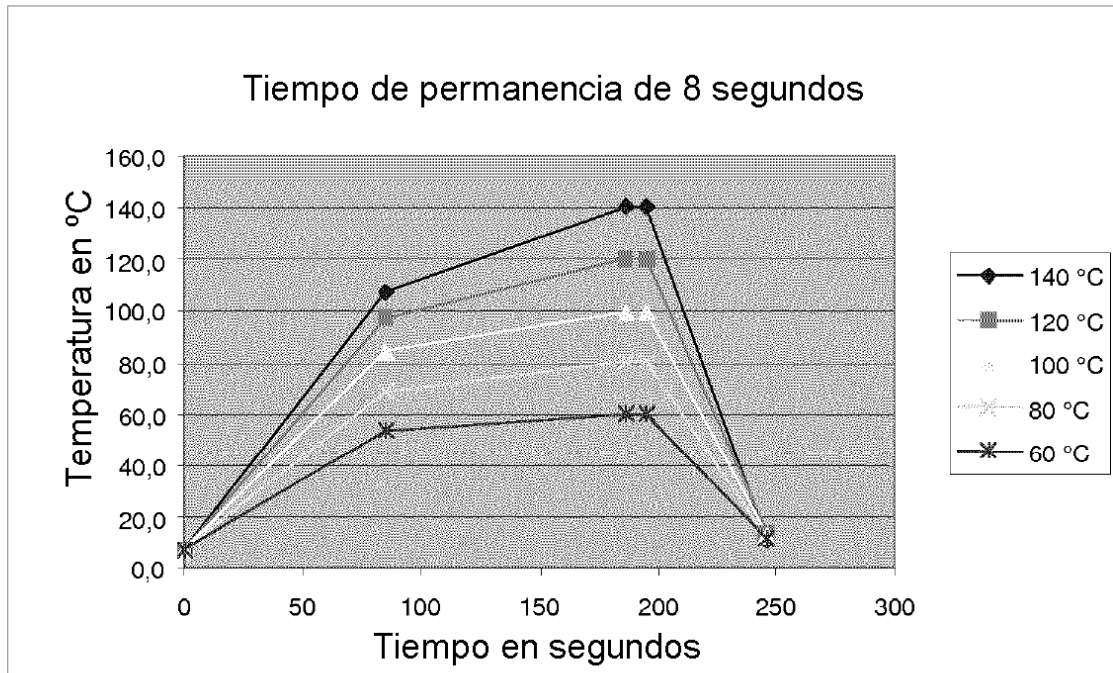


Figura 6

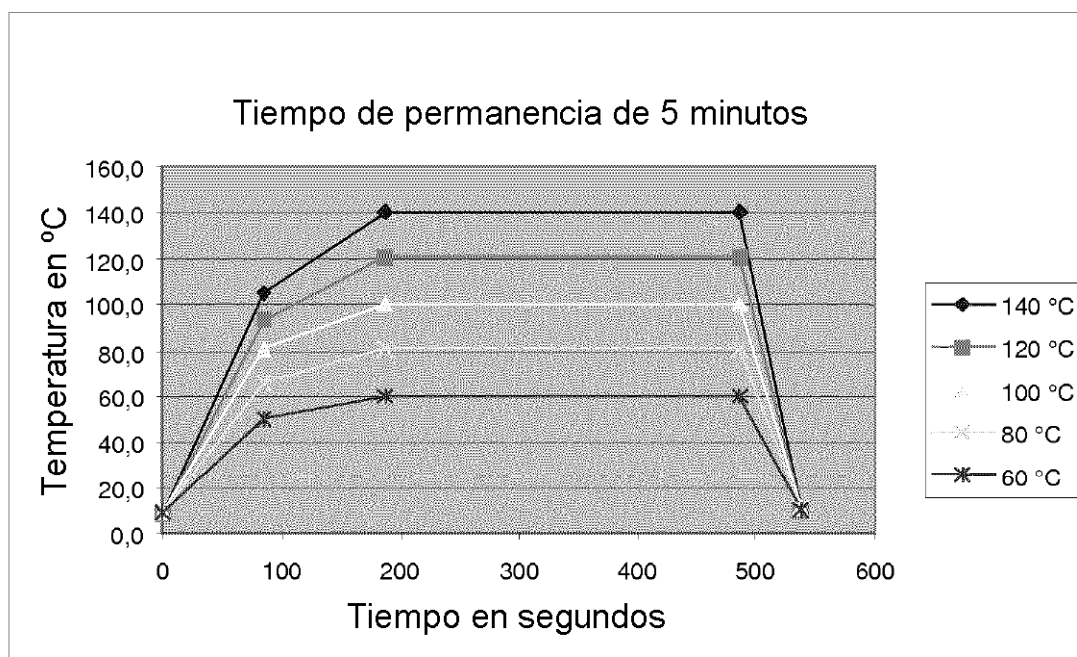


Figura 7