

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 656**

51 Int. Cl.:

A61K 6/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.05.2003** **E 15153638 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020** **EP 2921155**

54 Título: **Métodos para producir lípidos de alta calidad mediante liberación enzimática desde biomasa**

30 Prioridad:

03.05.2002 US 377550 P

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

22.07.2020

73 Titular/es:

DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)

Het Overloon 1

6411 TE Heerlen, NL

72 Inventor/es:

KOBZEFF, JOSEPH M. y

WEAVER, CRAIG A.

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 774 656 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

Métodos para producir lípidos de alta calidad mediante liberación enzimática desde biomasa

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 Se proporcionan métodos para producir lípidos de alta calidad que incluyen la etapa de liberar lípidos de biomasa algácea que comprende microorganismos del género *Schizochytrium*, usando un tratamiento enzimático.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 Se han empleado diversos métodos para extraer lípidos desde biomasa. Las técnicas incluyen extracción directa de la biomasa con disolventes, calentamiento, ondas de presión generadas a través de arcos eléctricos, saponificación directa a través de KOH y etanol, ultrasonidos, congelación y trituración y molinos de cuentas. Por ejemplo, la biomasa puede secarse y el lípido extraerse con un disolvente tal como hexano. Alternativamente, un caldo de fermentación microbiano se puede someter a condiciones extremas de pH y/o temperatura o se puede usar un equipo adicional tal como un homogeneizador para romper las células.

15 Problemas con los métodos anteriores incluyen una escasa calidad del producto debido a condiciones químicamente agresivas de alta temperatura y alto pH, altos costes debidos a la necesidad de secar la biomasa o para un equipo adicional tal como homogeneizadores y recipientes de presión.

20 Los sabores a pescado y pintura asociados con muchos ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) encontrados en los lípidos se deben principalmente a la oxidación de los dobles enlaces de los ácidos grasos. Normalmente, estas notas de sabor y olor se consideran defectos que pueden imposibilitar su uso en alimentos u otras aplicaciones. El estado oxidativo y la estabilidad de un lípido o un material que contiene lípido se puede medir de un número de modos. Técnicas de medida estándar incluyen el "índice de anisidina", "el índice de peróxido", el "índice de estabilidad oxidativa", "Rancimat" y análisis del espacio superior del cromatógrafo de gases con respecto a productos de oxidación. Información sobre estas diferentes técnicas está disponible de la AOCS (American Oil Chemists' Society) así como de otras fuentes.

30 El estado oxidativo del lípido o el material que contiene lípido está muy influenciado por las condiciones de procesamiento usadas para elaborar el material. Para materiales alimenticios, las condiciones durante el procesamiento así como los ingredientes reales y la calidad de los ingredientes afectarán al estado de oxidación. Para lípidos derivados por fermentación (p. ej., lípidos obtenidos a partir de microbios desarrollados en fermentadores, balsas, etc.), los ingredientes (fermentación y posfermentación) usados así como las condiciones durante la extracción y la fermentación del lípido afectarán a la calidad. Otras fuentes de PUFAs, tales como cultivos agrícolas y fuentes animales, también se verán afectadas por las condiciones de procesamiento usadas para obtener los lípidos y los materiales que contienen lípido.

35 El documento EP 1 178 118 A1 describe un método para la extracción de un aceite microbiano o unicelular, que comprende, por ejemplo, uno o más ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), directamente de células microbianas, lo que evita la necesidad de disolventes.

40 El documento US 5 969 169 describe un aceite de colza no hidrogenado que tiene una estabilidad oxidativa y una estabilidad a la fritura útiles para aplicaciones alimentarias, así como semillas, líneas de plantas y su descendencia de las que se deriva el aceite.

45 El documento US 6 270 828 describe la estabilización de una línea de colza para producir semillas que tienen un contenido de ácido alfa-linolénico menor que el del aceite de colza genérico.

50 El documento US 6 255 505 describe un aceite microbiano que contiene ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) con alto contenido de triglicéridos y una alta estabilidad oxidativa. Además, se describe un método para la recuperación de este aceite 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 a continuación de los gránulos secados usando un disolvente apropiado.

55 El documento US 6 201 145 describe un aceite de colza no hidrogenado que tiene una estabilidad oxidativa y una estabilidad a la fritura útiles para aplicaciones alimentarias, así como semillas, líneas de plantas y su descendencia de las que se deriva el aceite.

60 El documento US 5 130 242 describe un procedimiento para la producción heterotrófica o predominantemente heterotrófica de productos microbianos de células enteras o extraídos con una alta concentración de ácidos grasos altamente insaturados omega-3, producibles en un cultivo aeróbico bajo condiciones controladas usando cultivos biológicamente puros de microorganismos fúngicos unicelulares heterotróficos del orden *Thraustochytriales*.

SUMARIO DE LA INVENCION

La invención proporciona un método para obtener un lípido que contiene ácido graso poliinsaturado, que comprende las etapas:

- 5 a. proporcionar una biomasa que comprende microorganismos del género *Schizochytrium*, conteniendo dicha biomasa un ácido graso que contiene poliinsaturaciones;
- b. poner en contacto dicha biomasa con una enzima; y
- c. recuperar dicho lípido,

en donde dicha etapa de puesta en contacto de dicha biomasa con una enzima comprende tratar dicha biomasa con una proteasa.

10 Se divulga además un lípido que comprende ácido graso poliinsaturado, en donde el lípido tiene un índice de anisidina de 2 o menos y, en diversas realizaciones, el índice de anisidina puede ser tan bajo como 0,3 o menos. El ácido graso poliinsaturado del lípido puede ser un ácido graso poliinsaturado de cadena larga, que tiene una longitud de cadena de al menos 20 o al menos 22, y puede tener al menos tres o al menos cuatro dobles enlaces. Más particularmente, 15 el ácido graso poliinsaturado puede ser ácido docosahexaenoico, ácido docosapentaenoico o ácido araquidónico.

Se divulgan además productos seleccionados de complementos dietéticos, productos alimenticios, formulaciones farmacéuticas, leche animal humanizada o leche maternizada, en donde los productos incluyen un lípido que comprende ácido graso poliinsaturado y que tiene un índice de anisidina de 2 o menos.

20 En una realización de la presente invención, el método comprende liberar el lípido desde la biomasa a una temperatura de alrededor de 10°C a alrededor de 80°C a un nivel de pH de alrededor de pH 5 a alrededor de pH 9. Este método se efectúa en ausencia sustancial de un disolvente de extracción.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

25 La invención proporciona un método para obtener un lípido que contiene ácido graso poliinsaturado, que comprende las etapas:

- a. proporcionar una biomasa que comprende microorganismos del género *Schizochytrium*, conteniendo dicha biomasa un ácido graso que contiene poliinsaturaciones;
- b. poner en contacto dicha biomasa con una enzima; y
- 30 c. recuperar dicho lípido,

en donde dicha etapa de puesta en contacto de dicha biomasa con una enzima comprende tratar dicha biomasa con una proteasa.

35 Según una realización de la presente divulgación, se proporciona un lípido de alta calidad. En particular, el lípido tiene un bajo índice de anisidina. Preferiblemente, el índice de anisidina es 2 o menos, más preferiblemente 1,5 o menos, más preferiblemente 1 o menos, más preferiblemente 0,5 o menos y más preferiblemente 0,3 o menos. El índice de anisidina se puede considerar una medida de la historia oxidativa de un lípido. Valores superiores indican un lípido que ha experimentado más estrés oxidativo. Cuando un lípido se oxida, típicamente se convierte en un peróxido. Típicamente, este peróxido se convierte en un aldehído o una cetona. El índice de anisidina es una medida de estos 40 productos de oxidación secundarios. Los lípidos que contienen ácidos grasos poliinsaturados son muy sensibles a la oxidación y esta oxidación puede conducir a malos sabores. Se han empleado métodos para retirar estos malos sabores, pero estos métodos no retiran todos los productos de oxidación que pueden actuar como precursores de los malos sabores, y la oxidación. Como resultado, estos métodos de mejora del sabor solo conducen a una mejora temporal del sabor. El índice de anisidina es una medida de estos precursores de la oxidación y los malos sabores. El 45 método analítico para medir el índice de anisidina está disponible de la AOCS (American Oil Chemists' Society).

Según la presente invención, se proporciona un procedimiento para liberar lípidos. El procedimiento incluye una etapa de liberación de lípidos usando un tratamiento enzimático para, p. ej., la degradación de las paredes celulares del material que contiene lípido. Los lípidos se liberan de una biomasa que contiene lípidos usando una enzima proteasa, con lo que los componentes proteínicos del material que contiene lípidos se proteolizan.

50

Una realización adicional de la presente invención es un procedimiento que utiliza tensioactivos además de las enzimas para liberar los lípidos desde el material que contiene lípidos. Los inventores han encontrado sorprendentemente que el uso de tensioactivos junto con tratamiento enzimático puede permitir unas condiciones de reacción más suaves que con enzimas solas para la liberación de los lípidos. Los tensioactivos, tales como polisorbato 80, mono- y diglicéridos, u otros tensioactivos, se añaden preferiblemente aproximadamente al mismo tiempo que la enzima. Alternativamente, el tensioactivo se puede añadir antes o después de la enzima. En esta realización, preferiblemente, el lípido se libera de la biomasa sin usar condiciones extremas de temperatura o pH y sin usar un equipo adicional tal como un homogeneizador o secar la biomasa antes de la retirada del lípido. Por ejemplo, el tratamiento enzimático se puede efectuar a temperaturas por debajo de alrededor de 80°C, más preferiblemente por debajo de alrededor de 70°C y, aún más preferiblemente, por debajo de alrededor de 65°C, y en condiciones de pH de aproximadamente 5-9.

El uso de enzimas proteasa, o enzimas proteasa en combinación con tensioactivos, proporciona un modo económico y simple de descargar el lípido de la biomasa bajo condiciones suaves que conducen a elaborar un lípido de alta calidad. A continuación, el lípido se puede aislar del resto del caldo de fermentación mediante la centrifugación de la mezcla. En algunos casos, el lípido se incorporará a una emulsión. Para algunas aplicaciones, la propia emulsión podría ser el producto final. Para otras aplicaciones, la emulsión se trataría para descargar el lípido para recuperación separadamente. Se muestran técnicas en la Solicitud de Patente de EE. UU. N° 09/766.500 e incluyen pero no se limitan a, dilución, adición de un disolvente, cambios de temperatura, y congelación.

El uso de una enzima proteasa puede ayudar a romper proteínas estabilizadoras de la emulsión presentes, ayudando de ese modo a la ruptura de una emulsión. Además, el uso satisfactorio de una proteasa para la liberación de lípido desde microalgas es sorprendente debido a que las microalgas tienden a tener un bajo contenido de proteína (~15-22% en comparación con ~55% para *E. coli*) y tienen una estructura celular muy robusta debido a la presencia de sílice y polisacáridos tales como celulosa.

Esta etapa de procesamiento también permite la producción de lípidos que contienen ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) de cadena larga de calidad extremadamente alta según se mide por el índice de anisidina. La razón es que el procedimiento se puede realizar fácilmente bajo una atmósfera inerte, con bajas temperaturas y condiciones no reactivas.

En una realización particular, que usa el tratamiento proteolítico del material que contiene lípido sin un tensioactivo, el tratamiento proteolítico se puede efectuar a temperaturas superiores, suficientes para alcanzar niveles deseables de liberación de lípido. Por ejemplo, en esta realización, el tratamiento enzimático se efectúa a temperaturas de al menos alrededor de 30°C, más preferiblemente al menos alrededor de 40°C y lo más preferiblemente al menos alrededor de 50°C. Sin embargo, se debe conocer que, a temperaturas superiores, se puede producir la degradación de lípidos. Por lo tanto, se debe seleccionar una temperatura tal que se alcance la liberación de lípidos adecuada sin niveles inaceptables de degradación de lípidos.

Preferiblemente, los microorganismos se cultivan en un medio de fermentación en un fermentador. Alternativamente, los microorganismos se pueden cultivar fotosintéticamente en un fotobiorreactor o una balsa.

La biomasa comprende microorganismos del género *Schizochytrium* o sus mezclas, más preferiblemente, los microorganismos se seleccionan del grupo que consiste en microorganismos que tienen las características identificativas del número de la ATCC 20888 y el número de la ATCC 20889. Se debe apuntar que muchos expertos están de acuerdo en que *Ulkenia* no es un género separado de los géneros *Thraustochytrium* y *Schizochytrium*. En consecuencia, según se usa en la presente, los géneros *Thraustochytrium* y *Schizochytrium* incluirán *Ulkenia*. Información relativa a estas algas se puede encontrar en las Patentes de EE. UU. N° 5.407.957, 5.130.242 y 5.340.594.

Lípidos recuperados mediante la presente invención incluyen lípidos que comprenden un ácido graso poliinsaturado, más particularmente, un ácido graso poliinsaturado de cadena largo y, aún más particularmente, un ácido graso poliinsaturado presente en dicho lípido que tiene una longitud de la cadena de carbonos de al menos 20 o 22. Este ácido graso poliinsaturado presente puede tener al menos 3 o al menos 4 dobles enlaces. Más particularmente, el ácido graso poliinsaturado puede incluir ácido docosahexaenoico (al menos 10, 20, 30 o 35 por ciento en peso), ácido docosapentaenoico (al menos 5, 10, 15 o 20 por ciento en peso) y/o ácido araquidónico (al menos 20, 30, 40 o 50 por ciento en peso). Ácidos grasos poliinsaturados incluyen ácidos grasos libres y compuestos que comprenden residuos de PUFA, incluyendo fosfolípidos; ésteres de ácido grasos; triacilgliceroles; diacilglicéridos; monoacilglicéridos; lisofosfolípidos; fosfátidos; etc.

Para diferentes materiales que contienen aceite, se pueden emplear diferentes enzimas y condiciones de reacción. Para estos diferentes materiales, un criterio de selección de enzimas importante es seleccionar una enzima que ataque y degrade una porción del material (tal como las proteínas, polisacáridos, la pared celular, la membrana externa celular, la capa de peptidoglucano, celulosa, quitina, hemicelulosa, lignina, compuestos relacionados con lignina, etc.) que de otro modo impediría la recuperación del aceite. Preferiblemente, se pueden usar enzimas proteasa inespecíficas tales como tripsina, quimotripsina o similares para degradar componentes proteínicos de los materiales que contienen aceite y se pueden usar enzimas carbohidrasa tales como amilasa para degradar componentes de carbohidrato de los

materiales que contienen aceite. La selección de las condiciones de reacción, incluyendo el tipo de enzima, la concentración de enzima, la temperatura, el pH, la actividad de agua, la concentración de otros reactivos, el tiempo de reacción, etc., dependerá en parte de la enzima específica y el material del que se está liberando el lípido. Estas condiciones se pueden determinar fácilmente a partir de la información acerca de la enzima (y disponible típicamente del proveedor o en la bibliografía), o pueden ser determinadas por un experto en la especialidad. Las temperaturas típicas pueden variar entre aproximadamente 20-80°C, aunque algunas enzimas especiales pueden ser suficientemente activas y estables para el uso fuera de este intervalo. Concentraciones de enzima típicas pueden ser tan bajas como de 0,01% a varios porcentajes. La velocidad de reacción está relacionada con la concentración de enzima, permitiendo las concentraciones superiores tiempos de reacción más cortos. En algunas situaciones, es posible usar una concentración aún menor, tal como cuando una enzima particular es extremadamente activa o estable o cuando pueden ser prácticos tiempos de reacción muy prolongados.

Los lípidos se liberan eficazmente de organismos de *Schizochytrium* sp al tratar las células con una enzima proteasa. Es sorprendente que esta clase particular de enzimas sea eficaz para este organismo debido a la cantidad relativamente pequeña de proteína normalmente encontrada en la pared celular de este organismo. Los lípidos se pueden liberar de la biomasa, y preferiblemente los microorganismos, al tratar las células con enzimas u otros agentes o mediante otros métodos que atacan a otros componentes de la pared celular, tales como polisacáridos, o la capa lipídica. Este tratamiento con enzimas proporciona un método bajo condiciones suaves que permite la recuperación de lípidos de alta calidad. Otros métodos para la liberación de lípidos que se pueden usar, solos o en combinación con el tratamiento enzimático, incluyen tratamiento con detergentes, choque osmótico, ciclos de congelación/descongelación, autólisis, homogeneización, ultrasonidos y tratamiento térmico suave).

Una realización preferida el procedimiento de la presente invención incluye:

- Obtener organismos unicelulares que soportan lípido
- Tratar con proteasa o una combinación de tensioactivo y proteasa
- Separar el lípido del caldo (puede ser una emulsión)
 - Puede requerir un tratamiento adicional con un disolvente orgánico polar, sal, un agente de precipitación, otra enzima (proteasa u otro tipo), calentamiento, enfriamiento.
- Si el lípido procedente de la etapa anterior está en la forma de una emulsión, este producto puede usarse como tal o secarse y usarse o tratarse para descargar el lípido desde la emulsión
 - El tratamiento puede incluir un tratamiento con un disolvente orgánico polar, sal, un agente de precipitación, otra enzima (proteasa u otro tipo), calentamiento, enfriamiento, etc.
- A continuación, el lípido se puede secar, refinar, blanquear, desodorizar y/o hacer reaccionar según sea necesario.

El lípido también se puede tratar con antioxidantes y/o agentes capturadores de iones metálicos (tales como agentes quelantes, una resina de intercambio iónico, agentes de precipitación) en cualquier punto antes, durante o después del procedimiento.

Según se apunta anteriormente, la presente invención abarca el uso de una proteasa en presencia de un tensioactivo para recuperar lípido desde una biomasa. Tensioactivos adecuados incluyen, pero no se limitan a: un fosfolípido, un lisofosfolípido, un monoglicérido, diglicéridos, glicéridos mixtos, glicéridos parciales, jabones, ácidos grasos, sales de ácidos grasos, aminas, un antiespumante, ácidos o sales de ácido sulfónico, detergentes, polisorbatos (p. ej., monooleato de polietilensorbitano), ácidos y ésteres alifáticos, moléculas orgánicas polares, alcoholes, sulfatos y sulfonatos, compuestos que contienen nitrógeno (p. ej. aminas, amidas, poliamidas), fosfatos (p. ej. difosfato de alquilo-alquileo, fosfato de tributilo), siliconas (p. ej. tri- y tetra-alquilsilanos, sílice que contiene polímero silicónico, polímeros de dimetilsilicona, metilsiliconas), sulfuros y tioderivados, compuestos halogenados, triacilglicerolos, ceras grasas de cadena larga (p. ej. aceites y ceras vegetales), aceites minerales, un derivado sulfatado de triacilglicerolos y aceites minerales, bentonita, y fosfato monosódico mezclado con ácido bórico y carbonato de etilo.

En una realización adicional, el procedimiento se puede efectuar con una combinación de enzimas. Más específicamente, se pueden usar una proteasa y una lipasa. Una lipasa es una enzima que hidroliza glicéridos. Por lo tanto, se necesita tener cuidado para evitar niveles inaceptables de degradación de glicéridos en el producto lipídico. Por ejemplo, una lipasa hidrolizará un triglicérido produciendo un ácido graso libre y un diglicérido. Se cree, sin pretender ligarse a una teoría, que este mecanismo es beneficioso hasta un punto debido a que los productos de la degradación enzimática funcionan como tensioactivos que tienen los beneficios descritos anteriormente en la realización de la invención que implica el uso directo de tensioactivos. Sin embargo, existe el potencial de que el

producto lipídico pudiera ser degradado inaceptablemente por la lipasa. Por lo tanto, realizaciones adicionales implican el uso de pequeñas cantidades de lipasa o condiciones bajo las que la lipasa solo es activa una pequeña cantidad de tiempo. Este control de la actividad de lipasa se podría controlar, por ejemplo, mediante el uso de enzimas sensibles a la temperatura o la introducción de inhibidores de lipasa.

5 En otra realización de la presente invención, los procedimientos de la presente invención se combinan con técnicas de oxidación-reducción adicionales, incluyendo una o más de: exclusión de aire (y oxígeno) y otros agentes oxidantes, procesamiento con condiciones suaves (temperatura moderada, pH moderado, tiempos de procesamiento cortos, etc.), exclusión de iones metálicos tales como cobre y hierro, exclusión de lípidos previamente oxidados (aunque se purifiquen posteriormente), exclusión de precursores de la oxidación, y la presencia de compuestos antioxidantes (tales como tocoferoles, tocotrienoles, BHA, camisol, ácido camósico, ácido ascórbico, ésteres de ácido L-ascórbico (incluyendo palmitato de ascorbilo L, estearato de ascorbilo L, oleato de ascorbilo L), romero, etc. así como ésteres o derivados de estos compuestos), para obtener lípidos mínimamente oxidados.

15 En algunos casos, después de que los lípidos se liberen desde la biomasa, los lípidos se pueden separar directamente de los materiales no deseados (p. ej., residuos celulares), tal como mediante centrifugación, u otros métodos apropiados. En otros casos, se puede añadir un agente tal como un alcohol u otro disolvente orgánico polar para facilitar la separación del lípido liberado del otro material. En otros casos adicionales, se puede añadir un disolvente que disolverá el lípido y facilitará la separación del lípido liberado del otro material, p. ej., mediante extracción con disolvente. Técnicas para separar los lípidos de materiales no deseados se pueden encontrar en la Patente de EE. UU. Número 5.928.696, la Solicitud de Patente de EE. UU. Número 09/766.500 y las Solicitudes PCT Número US01/12047 y US01/12049. Otra realización de la invención implica el uso de una combinación del tratamiento con enzima, o el tratamiento con enzima más tensioactivo, junto con homogeneización. En algunos casos, esta combinación puede alcanzar una calidad superior y/o un rendimiento superior que con homogeneización o tratamiento con enzima solos. Se cree que la homogeneización puede facilitar la reacción enzimática al permitir un contacto más íntimo entre la enzima y su sustrato. También se cree que el tratamiento con enzima puede facilitar la homogeneización al debilitar las paredes celulares y permitir el uso de condiciones de homogeneización (presión o cizalladura) menos extremas. El uso de homogeneización con el procedimiento con enzima o enzima-tensioactivo puede permitir el uso de condiciones que son más suaves químicamente de lo que sería posible sin la homogeneización. En otros casos, este procedimiento combinado puede permitir el uso de una homogeneización a presión inferior (y también coste inferior).

35 Según una realización adicional de la presente invención, los procedimientos descritos previamente se pueden emplear sobre material que soporta lípido. Aunque el procedimiento de calidad más alta y costes más bajos normalmente se esperaría de material que no se ha secado, hay casos en los que sería ventajoso secar el material bien antes o bien en algún punto intermedio durante el procedimiento, antes de la separación del lípido. El uso de los procedimientos descritos previamente con secado puede proporcionar una mejora parcial en la calidad y/o el coste sobre procedimientos que incluyen secado y no incluyen los procedimientos inventados. Algunos ejemplos de cuándo sería apropiada esta etapa de secado son cuando la instalación para la separación del lípido está situada lejos de la instalación de fermentación u otra aguas arriba, o cuando haya dificultades de planificación entre la instalación de separación de lípido y la instalación aguas arriba, o cuando el material que contiene lípido se deba almacenar antes de separar el lípido.

45 En un aspecto de la presente invención, el lípido se usa en un producto final seleccionado del grupo que consiste en un complemento dietético, un producto alimenticio, una formulación farmacéutica, una leche animal humanizada y una leche maternizada. Una formulación farmacéutica puede incluir, pero no se limita a: una formulación antiinflamatoria, un agente quimioterapéutico, un excipiente activo, un fármaco para la osteoporosis, un antidepresivo, un anticonvulsivo, un fármaco contra *Helicobacter pylori*, un fármaco para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa, un fármaco para el tratamiento de una hepatopatía degenerativa, un antibiótico y una formulación reductora del colesterol. En un aspecto, el producto final se usa para tratar una afección seleccionada del grupo que consiste en: inflamación crónica, inflamación aguda, un trastorno gastrointestinal, cáncer, caquexia, reestenosis cardíaca, un trastorno neurodegenerativo, un trastorno degenerativo del hígado, un trastorno de los lípidos sanguíneos, osteoporosis, osteoartritis, un enfermedad autoinmunitaria, preeclampsia, parto prematuro, maculopatía asociada a la edad, un trastorno pulmonar, esquizofrenia, depresión, mantenimiento del peso y un trastorno peroxisomático. Los siguientes ejemplos se proporcionan con propósitos de ilustración.

Ejemplos

Ejemplo 1.

60 Se diluyó y tamponó caldo de fermentación de *Schizochytrium* sp. como sigue: se combinaron 25 ml de caldo con 65 ml de agua destilada y a continuación se añadieron 10 ml de tampón de pH 6,0 (ácido 2-[N-morfolino]jetanosulfónico 1,0 M).

A dos partes alícuotas diferentes de esta mezcla de caldo se añadieron diferentes combinaciones de enzima y tensioactivo. Después de las adiciones de enzima y tensioactivo, las muestras se incubaron a 45°C durante 1,5 h y a continuación se examinaron mediante un microscopio con respecto al grado de lisis. Los resultados se muestran posteriormente:

5

Enzima*	Tensioactivo	Grado de lisis
Ninguna	Polisorbato 80	Sin lisis
Viscozyme® L	Polisorbato 80	Sin lisis
Alcalase® 2.4L FG, Viscozyme® L	Polisorbato 80	Lisis mayoritaria
Alcalase® 2.4L FG	Polisorbato 80	Lisis virtualmente total
Viscozyme® L	Ninguno	Sin lisis
Alcalase® 2.4L FG	Ninguno	Principalmente sin lisis

*Las enzimas son ambas de Novozymes North America, Inc. de Franklinton, NC.

Este ejemplo demuestra tanto la lisis satisfactoria del organismo con enzimas como la mejora de la lisis con la inclusión de un tensioactivo, polisorbato 80.

10

Ejemplo 2

Se diluyó y tamponó caldo de fermentación de *Schizochytrium* sp. como en el Ejemplo 1.

Una proteasa comercial (Alcalase® 2.4 L FG, disponible de Novozymes North America, Inc. de Franklinton, NC) y una carbohidrasa comercial (Viscozyme® L, disponible de Novozymes North America, Inc. de Franklinton, NC) se añadieron al caldo diluido y tamponado. Esta mezcla de caldo se dividió y se añadieron diferentes tensioactivos como sigue:

15

1. Polisorbato 80

2. Laurilsulfato sódico

20

3. Mono y diglicéridos (Dimodan CO-K de Danisco de New Century, KA)

Después de la adición de los tensioactivos, cada muestra se calentó en un baño de agua caliente (75°C) durante aprox. 5 min. A continuación, cada muestra se mantuvo durante la noche a temperatura ambiente con mezcladura en un mezclador hematológico/químico de Fisher. Las muestras se examinaron bajo un microscopio con respecto al grado de lisis. Los resultados se muestran posteriormente:

25

Tensioactivo	Grado de lisis
Polisorbato 80	~100%
Laurilsulfato sódico	~40-60%
Dimodan CO-K	~100%

Este ejemplo demuestra que se pueden usar diferentes tensioactivos. En este caso, tanto el polisorbato 80 como los mono y diglicéridos (Dimodan) eran satisfactorios. El laurilsulfato sódico no era tan satisfactorio debido a que este producto químico particular ataca a las enzimas.

30

Ejemplo 3.

Caldo de fermentación de *Schizochytrium* sp. se trató con antioxidantes (palmitato de ascorbilo y tocoferoles) y se secó en tambor. A continuación, esta biomasa secada se trató como sigue:

- Se añadió a agua destilada (51 g de biomasa a 300 g de agua)
- 5 • El pH se ajustó hasta el intervalo de 6,9-7,3 con H₂SO₄ 2 N
- La mezcla se calentó hasta 60°C en un baño de agua
- Se añadieron 1,5 ml de Alcalase 2.4L FG
- A continuación, la mezcla de caldo se purgó con nitrógeno para excluir oxígeno y se incubó a 60°C durante 15 horas
- 10 • Se añadieron 120 ml de isopropanol (99,9%) con mezcladura suave
- A continuación, la mezcla de caldo-alcohol se centrifugó a 4000 RPM durante 5 minutos
- La fase lipídica (sobrenadante) se recogió

El lípido recogido se probó con respecto al índice de anisidina y peróxido mediante los métodos de la AOCS (American Oil Chemists Society) Cd 8-53 y Cd 18-90.

15 Una muestra de la biomasa secada también se extrajo con hexano al combinar con hexano y moler con molino de bolas en un sistema de extracción con tubo sueco. El lípido recogido se probó con respecto al índice de anisidina y el índice de peróxido como la otra muestra de lípido.

20 Los resultados de la prueba del lípido recogido mediante los dos métodos se muestran posteriormente:

Muestra	Índice de Peróxido	Índice de anisidina
Enzima, método del isopropanol	<0,1	0,8
Extraída con hexano	<0,1	3,0

25 Este ejemplo demuestra la lisis satisfactoria de las células con enzimas, el aislamiento del lípido que estaba presente en las células y la muy alta calidad del lípido (índice de anisidina muy bajo).

30 El análisis precedente de la invención se ha presentado con propósitos de ilustración y descripción. Aunque la descripción de la invención ha incluido la descripción de una o más realizaciones y ciertas variaciones y modificaciones, otras variaciones y modificaciones están dentro del alcance de la invención, p. ej., como puede estar dentro de la experiencia y el conocimiento de los expertos en la especialidad después de comprender la presente divulgación. Se pretende obtener derechos que incluyan realizaciones alternativas hasta el punto permitido, incluyendo estructuras, funciones, intervalos o etapas alternativos, intercambiables y/o equivalentes a los reivindicados, se divulguen o no en la presente estas estructuras, funciones, intervalos o etapas alternativos, intercambiables y/o equivalentes, y sin pretender dedicarse públicamente a ningún asunto patentable.

35

REIVINDICACIONES

1. Un método para obtener un lípido que contiene ácido graso poliinsaturado, que comprende las etapas:
 - a. proporcionar una biomasa que comprende microorganismos del género *Schizochytrium*, conteniendo dicha biomasa un ácido graso que contiene poliinsaturaciones;
 - 5 b. poner en contacto dicha biomasa con una enzima; y
 - c. recuperar dicho lípido,en donde dicha etapa de puesta en contacto de dicha biomasa con una enzima comprende tratar dicha biomasa con una proteasa.
- 10 2. El método según la reivindicación 1, en el que el tratamiento enzimático se efectúa a una temperatura de 10°C a 80°C y a un pH de 5 a 9 en ausencia sustancial de un disolvente de extracción.
3. El método según la reivindicación 2, en el que dicha temperatura es de 30°C a 70°C.
- 15 4. El método según la reivindicación 2, en el que dicha temperatura es de 40°C a 65°C.
5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha etapa de puesta en contacto de dicha biomasa con una enzima comprende tratar dicha biomasa con una combinación de un tensioactivo y una proteasa.
- 20 6. El método según una cualquiera de la reivindicación 1 a 5, en el que dicha etapa de puesta en contacto de dicha biomasa con una enzima comprende tratar dicha biomasa con proteasa y una lipasa.
7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además la etapa de separar el lípido de un caldo de fermentación.
- 25 8. El método según la reivindicación 7, en el que dicho lípido separado está en la forma de una emulsión.
9. El método según la reivindicación 8, en el que dicha emulsión se usa como una emulsión, se seca y se usa como una emulsión secada o se trata para descargar el lípido desde la emulsión.
- 30 10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además al menos un tratamiento adicional seleccionado del grupo que consiste en tratamiento con un disolvente orgánico polar, sal, un agente de precipitación, otra enzima, calentamiento o enfriamiento.
- 35 11. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho lípido se trata además mediante al menos un tratamiento seleccionado del grupo que consiste en secado, refinado, blanqueamiento, desodorización y reacción.
- 40 12. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho lípido se trata además mediante al menos un tratamiento seleccionado del grupo que consiste en tratamiento con antioxidantes y/o agentes capturadores de iones metálicos (tales como agentes quelantes, una resina de intercambio iónico, agentes de precipitación).
- 45 13. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que dicho ácido graso poliinsaturado incluye ácido docosahexaenoico, ácido docosapentaenoico y/o ácido araquidónico.
- 50 14. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el lípido obtenido tiene un índice de anisidina de 2 o menos.
15. El método según la reivindicación 14, en el que el lípido obtenido tiene un índice de anisidina de 1,5 o menos.
16. El método según la reivindicación 15, en el que el lípido obtenido tiene un índice de anisidina de 1 o menos.
17. El método según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en el que dicho ácido graso poliinsaturado comprende ácido docosahexaenoico.