(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 796 079**

(51) Int. CI.:

A23L 33/115 (2006.01)
A23D 7/00 (2006.01)
C11B 3/00 (2006.01)
A23D 9/00 (2006.01)
A61K 31/202 (2006.01)
C11B 1/02 (2006.01)
C11B 1/10 (2006.01)
C11B 3/04 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.12.2014 PCT/US2014/071459**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015 WO15095688**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2014 E 14872265 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2020 EP 3082793**

(54) Título: **Procesos para obtener aceite microbiano de células microbianas**

(30) Prioridad:

20.12.2013 US 201361918922 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.11.2020

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

BARKER, MARK;
TABAYEHNEJAD, NASRIN;
SHANK, GINGER;
LEININGER, NEIL FRANCIS y
MATTHEWS, SR., KIRT LYVELL

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

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

Procesos para obtener aceite microbiano de células microbianas

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

En el presente documento se desvelan procesos para obtener aceite microbiano que comprende uno o más ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) de una o más células microbianas de *Mortierella alpina* lisando las células para formar una composición de células lisadas y luego recuperando el aceite de la composición de células lisadas.

El aceite microbiano que contiene uno o más PUFAs se produce por microorganismos, tales como, por ejemplo, algas y hongos.

Un proceso típico para obtener aceite que contiene PUFAs de células microbianas implica cultivar microorganismos que son capaces de producir el aceite deseado en un fermentador, estanque o biorreactor para producir una biomasa de células microbianas; separar la biomasa del medio de fermentación en que se cultivó la biomasa; secar la biomasa de células microbianas, usar un disolvente orgánico inmiscible en agua (por ejemplo, hexano) para extraer el aceite de las células secadas; y retirar el disolvente orgánico (por ejemplo, hexano) del aceite. Este proceso puede implicar además diluir el medio de fermentación que contiene la biomasa de células con agua, seguido por centrifugación para separar la biomasa del medio de fermentación diluido.

Otro proceso para obtener aceite que contiene PUFAs de células microbianas implica cultivar microorganismos que son capaces de producir el aceite deseado en un fermentador, estanque o biorreactor para producir una biomasa de células microbianas; liberar el aceite que contiene PUFAs en el medio de fermentación en que las células se cultivaron usando fuerza mecánica (por ejemplo, homogeneización), tratamiento enzimático o tratamiento químico para romper las paredes celulares; y recuperar el aceite de la composición resultante que comprende aceite que contiene PUFA, residuo celular y líquido usando un disolvente orgánico miscible en agua, por ejemplo, alcohol isopropílico. El aceite se puede separar mecánicamente de la composición y el alcohol se debe retirar de tanto el aceite como la corriente residual de biomasa acuosa.

El empleo a escala industrial de cualquiera de los procesos anteriores para obtener aceites que contienen PUFAs de células microbianas requiere el uso de una gran cantidad de disolvente orgánico volátil e inflamable, que crea condiciones de operación peligrosas y requiere el uso de un caro equipo resistente a las explosiones. Además, el uso de un disolvente orgánico genera una corriente residual de disolvente orgánico que requiere la implementación de un caro proceso de recuperación del disolvente para tratar los estrictos límites medioambientales sobre emisiones de compuestos orgánicos volátiles (VOC), que a su vez da como resultado la necesidad de más mano de obra y equipo caro.

Además, el uso de calor en los procesos anteriores para secar las células y/o retirar el disolvente del aceite recuperado puede degradar los aceites que contienen PUFAs y aumentar el consumo de energía, que puede aumentar adicionalmente los costes de procesamiento. La degradación ocurre cuando los aceites que contienen PUFAs se exponen a oxígeno, tal como cuando se rompe la integridad de las paredes celulares microbianas y/o las células microbianas se exponen a calor.

Un proceso libre de disolvente para obtener aceite que contiene PUFAs de células microbianas implica cultivar microorganismos que son capaces de producir el aceite deseado en un fermentador, estanque o biorreactor para producir una biomasa de células microbianas; liberar el aceite que contiene PUFAs en el medio de fermentación en que se cultivaron las células usando fuerza mecánica (por ejemplo, homogeneización), tratamiento enzimático o tratamiento químico para romper las paredes celulares; y recuperar aceite en bruto de la composición resultante que comprende aceite que contiene PUFAs, residuo celular y líquido elevando el pH, añadiendo una sal, calentando y/o agitando la composición resultante. Sin embargo, este proceso libre de disolvente para obtener aceite que contiene PUFAs de células puede requerir largos tiempos de recuperación de aceite, grandes cantidades de sal y/o muchas etapas, que pueden todos aumentar los costes de procesamiento.

Como resultado, sigue existiendo una necesidad de un proceso de obtención de aceites de alta calidad que contengan PUFAs de células microbianas que no use un disolvente orgánico volátil, se pueda realizar usando equipo fácilmente disponible, requiera un número mínimo de etapas, tenga tiempos de recuperación de aceite más cortos y pueda proporcionar un alto rendimiento de aceite de alta calidad que contiene PUFAs.

El documento de patente WO 2011/153246 desvela un proceso de obtención de un lípido de una célula lisando la célula, poniendo en contacto la célula con una base y/o sal, y separando el lípido.

El documento de patente US 2012/0190872 desvela un método para la recuperación de compuestos oleaginosos a partir de biomasa. El método implica un tratamiento hidrotérmico.

El documento de patente US 2010/0261918 desvela un proceso de separación para separar aceite de lípido de una biomasa de algas para la producción de biocombustible.

La invención proporciona un proceso de obtención de aceite microbiano que comprende uno o más ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) de una o más células microbianas de *Mortierella alpina* que comprende (a) lisar las células que comprenden el aceite microbiano para formar una composición de células lisadas; (b) desemulsionar la composición de células lisadas que comprende reducir el pH de la composición de células lisadas a desde 0,5 hasta 6 para formar una composición desemulsionada de células lisadas; (c) separar el aceite de la composición desemulsionada de células lisadas; y (d) recuperar el aceite.

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) se clasifican basándose en la posición del primer doble enlace del extremo de metilo del ácido graso; los ácidos grasos omega-3 (n-3) contienen un primer doble enlace en el tercer carbono, mientras que los ácidos grasos omega-6 (n-6) contienen un primer doble enlace en el sexto carbono. Por ejemplo, el ácido docosahexaenoico (DHA) es un ácido graso poliinsaturado omega-3 de cadena larga (LC-PUFA) con una longitud de cadena de 22 carbonos y 6 dobles enlaces, frecuentemente designado "22:6n-3." En una realización, el PUFA se selecciona de un ácido graso omega-3, un ácido graso omega-6 y mezclas de los mismos. En otra realización, el PUFA se selecciona de LC-PUFAs. Aún en una realización adicional, el PUFA se selecciona de ácido docosahexaenoico (DHA), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosapentaenoico (DPA), ácido araquidónico (ARA), acido gamma-linolénico (GLA), acido dihomo-gamma-linolénico (DGLA), ácido estearidónico (SDA) y mezclas de los mismos. En otra realización, el PUFA se selecciona de DHA, ARA y mezclas de los mismos. En una realización adicional, el PUFA es DHA. Aún en una realización adicional, el PUFA es ARA.

Los LC-PUFAs son ácidos grasos que contienen al menos 3 dobles enlaces y tienen una longitud de cadena de 18 o más carbonos o 20 o más carbonos. Los LC-PUFAs de la serie omega-6 incluyen, pero no se limitan a, ácido di-homo-gamma-linoleico (C20:3n-6), ácido araquidónico (C20:4n-6) ("ARA"), ácido docosatetraenoico o ácido adrénico (C22:4n-6) y ácido docosapentaenoico (C22:5n-6) ("DPA n-6"). Los LC-PUFAs de la serie omega-3 incluyen, pero no se limitan a, ácido eicosatrienoico (C20:3n-3), ácido eicosatetraenoico (C20:4n-3), ácido eicosapentaenoico (C20:5n-3) ("EPA"), ácido docosapentaenoico (C22:5n-3) y ácido docosahexaenoico (C22:6n-3). Los LC-PUFAs también incluyen ácidos grasos con más de 22 carbonos y 4 o más dobles enlaces que incluyen, pero no se limitan a, C24:6(n-3) y C28:8(n-3).

Los PUFAs pueden estar en forma de un ácido graso libre, sal, éster de ácido graso (por ejemplo, éster metílico o etílico), monoacilglicerol (MAG), diacilglicerol (DAG), triacilglicerol (TAG) y/o fosfolípido (PL).

Los ácidos grasos altamente insaturados (HUFAs) son ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y/o omega-6 que contienen 4 o más enlaces carbono-carbono insaturados.

Como se usa en el presente documento, una "célula" se refiere a un material biológico que contiene aceite, tal como material biológico derivado de microorganismos oleaginosos. El aceite producido por un microorganismo u obtenido a partir de una célula microbiana se denomina "aceite microbiano". El aceite producido por algas y/u hongos también se denomina aceite de algas y/o fúngico, respectivamente.

Como se usa en el presente documento, una "célula microbiana" o "microorganismo" se refiere a organismos tales como algas, bacterias, hongos, protista, levadura y combinaciones de los mismos, por ejemplo, organismos unicelulares.

En el proceso según la invención, las células microbianas son de *Mortierella alpina.*

El proceso según la invención comprende lisar las células microbianas que comprenden el aceite microbiano para formar una composición de células lisadas. Los términos "lisar" y "lisado" se refieren a un proceso por el cual se rompe la pared y/o membrana de la célula microbiana. En una realización, la célula microbiana se lisa sometiéndose a al menos un tratamiento seleccionado de mecánico, químico, enzimático, físico y combinaciones de los mismos. En otra realización, el proceso comprende lisar las células microbianas que comprenden el aceite microbiano para formar una composición de células lisadas, en donde el lisado se selecciona de mecánico, químico, enzimático, físico y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, antes de lisar la célula, la célula se puede lavar y/o pasteurizar. En algunas realizaciones, el lavado de las células incluye usar una disolución acuosa, tal como agua, para retirar cualquier compuesto extracelular soluble en agua o dispersable en agua. En algunas realizaciones, la célula se puede lavar una vez, dos veces, tres veces o más. En algunas realizaciones, la pasteurización de la célula incluye calentar la célula para inactivar cualquier enzima no deseable, por ejemplo cualquier enzima que pudiera degradar el aceite o reducir el rendimiento de PUFAs. En algunas realizaciones, la célula se lava y luego se pasteuriza antes de ser lisada. En algunas realizaciones, las células que están siendo lisadas están contenidas en un caldo de fermentación.

En algunas realizaciones, el proceso comprende lisar las células microbianas no lavadas que comprenden un aceite microbiano para formar una composición de células lisadas. En algunas realizaciones, un caldo de fermentación que comprende células microbianas que comprende aceite microbiano se lava primero con, por ejemplo, agua y luego se lisan las células para formar una composición de células lisadas. En otras realizaciones, el proceso comprende lisar células no lavadas en un medio de fermentación para formar una composición de células lisadas.

El tratamiento mecánico incluye, pero no se limita a, homogeneización, ultrasonidos, prensado en frío, molienda y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el proceso comprende lisar las células por homogeneización. En algunas realizaciones, el proceso comprende lisar la célula con un homogeneizador.

La homogenización incluye, pero no se limita a, procesos que utilizan una prensa francesa de células, sonicador, homogeneizador, microfluidizador, molino de bolas, molino de barras, molino de guijarros, molino de perlas, rodillo de trituración a alta presión, impactador de eje vertical, mezcladora industrial, mezcladora de alto cizallamiento, mezcladora de palas, homogeneizador Polytron, homogeneizador industrial (por ejemplo, homogeneizador Niro Soavi VHP y homogeneizadores APV Rannie y APV Gaulin), procesadores industriales de fluido de alto cizallamiento (por ejemplo, procesador de fluidos de alto cizallamiento Microfluidics), homogeneizadores de lisado celular / molino de perlas (por ejemplo, Dyno-Mill y Buhler) y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, las células circulan a través de un homogeneizador que se calienta opcionalmente. En algunas realizaciones, la homogeneización adecuada puede incluir 1 a 3 pases a través de un homogeneizador a altas y/o bajas presiones.

En algunas realizaciones, la presión durante la homogeneización es 150 bar a 1.400 bar; 150 bar a 1.200 bar; 150 bar a 900 bar; 150 bar a 300 bar; 300 bar a 1,400 bar; 300 bar a 1,200 bar; 300 bar a 900 bar; 400 bar a 800 bar; 500 bar a 700 bar; o 600 bar.

En algunas realizaciones, las células microbianas se mezclan en mezcladora de alto cizallamiento antes de ser homogeneizadas. En algunas realizaciones, la mezcladora de alto cizallamiento opera en un intervalo de al menos 5.000 rpm; al menos 7.500 rpm; al menos 10.000 rpm; al menos 12.500 rpm; al menos 15.000 rpm; 5.000 rpm a 15.000 rpm; 5.000 rpm a 12.500 rpm; 5.000 rpm a 10.000 rpm; 5.000 rpm a 7.500 rpm; 7.500 rpm a 15.000 rpm; 7.500 rpm a 12.500 rpm; 7.500 rpm a 10.000 rpm; 10.000 rpm a 15.000 rpm; 10.000 rpm a 12.500 rpm; o 12.500 rpm a 15.000 rpm.

El tratamiento incluye, pero no se limita a, calentamiento, que incluye, pero no se limita a, resistivo, convección, vapor de agua, baño de fluido, solar y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, las células se calientan en un tanque con bobinas resistivas dentro / sobre sus paredes. En algunas realizaciones, las células se calientan en un baño líquido con tubos que pasan a través.

El tratamiento químico incluye, pero no se limita a, elevar el pH de las células; reducir el pH de las células; poner en contacto las células con un producto químico; y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, las células se lisan elevando el pH de las células. En algunas realizaciones, el pH se eleva añadiendo una base. Las bases incluyen, pero no se limitan a, hidróxidos (por ejemplo, LiOH, NaOH, KOH y $Ca(OH)_2$ y combinaciones de los mismos); carbonatos (por ejemplo, Na_2CO_3, K_2CO_3, $MgCO_3$ y combinaciones de los mismos); bicarbonatos (por ejemplo, $LiHCO_3$, $NaHCO_3$, $KHCO_3$ y combinaciones de los mismos); y combinaciones de los mismos. La base puede estar en forma de un sólido (por ejemplo, cristales, gránulos y pellas); un líquido (por ejemplo, una disolución acuosa; y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, la base tiene un pK_b de 1 a 12, 1 a 10, 1 a 8, 1 a 6, 1 a 5, 2 a 12, 2 a 10, 2 a 8, 2 a 6, 2 a 5, 3 a 10, 3 a 6, 3 a 5, 4 a 10, 4 a 8, 4 a 6, 5 a 10 o 5 a 8. Como se usa en el presente documento, el término "pK_b" se refiere al logaritmo negativo de la constante de asociación de la base, K_b, de la base. K_b se refiere a la constante de equilibrio para la ionización de la base en agua, en donde: $B + H_2O \rightleftarrows HB^+ + OH^-$; y K_b de base, B, se define como:

$$K_b = \frac{[HB^+][OH^-]}{[B]}.$$

En algunas realizaciones, el pH se selecciona desde aproximadamente 8 o superior; aproximadamente 9 o superior; aproximadamente 10 o superior; aproximadamente 11 o superior; y aproximadamente 12 o superior. En otras realizaciones, el pH se selecciona de un pH de 7 a 13; 7 a 12; 7 a 11; 7 a 10; 7 a 9; 8 a 13; 8 a 12; 8 a 11; 8 a 10; 8 a 9; 9 a 12; 9 a 11; 9 a 10; 10 a 12; y 10 a 11.

En algunas realizaciones, el pH de las células se puede elevar por un proceso cloroalcalino. En algunas realizaciones, el caldo de fermentación que contiene cloruro sódico y las células se somete a electrólisis dando como resultado la formación de hidróxido sódico, que eleva el pH de las células. En algunas realizaciones, el caldo de fermentación incluye cloruro de calcio o cloruro de potasio en lugar de, o además de, cloruro sódico y la electrólisis da como resultado la formación de hidróxido de calcio o hidróxido potásico, respectivamente, elevando así el pH de la célula.

En algunas realizaciones, las células se lisan reduciendo el pH de las células. En algunas realizaciones, el pH se reduce añadiendo un ácido. Los ácidos incluyen, pero no se limitan a, sulfúrico; fosfórico; clorhídrico; bromhídrico; yodhídrico; hipocloroso; cloroso; clórico; perclórico; fluorosulfúrico; nítrico; fluoroantimónico; fluorobórico; hexafluorofosfórico; crómico; bórico; acético; cítrico; fórmico; y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el pH se selecciona desde aproximadamente 7 o inferior; aproximadamente 6,5 o inferior; aproximadamente 6 o inferior; aproximadamente 5,5 o inferior; aproximadamente 5 o inferior; aproximadamente 4,5 o inferior; aproximadamente 4 o inferior; aproximadamente 3,5 o inferior; aproximadamente 3 o inferior;

aproximadamente 2,5 o inferior; aproximadamente 2 o inferior; aproximadamente 1,5 o inferior; aproximadamente 1 o inferior; y aproximadamente 0,5 o inferior. En otras realizaciones, el pH se selecciona desde aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 7; aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 6,5; aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 6; aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 5,5; aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 5; aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 4,5; aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 4; aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 3,5; aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 3; aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 2,5; aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 2; aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 1,5; aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 1; aproximadamente 1 hasta aproximadamente 7; aproximadamente 1 hasta aproximadamente 6,5; aproximadamente 1 hasta aproximadamente 6; aproximadamente 1 hasta aproximadamente 5,5; aproximadamente 1 hasta aproximadamente 5; aproximadamente 1 hasta aproximadamente 4,5; aproximadamente 1 hasta aproximadamente 4; aproximadamente 1 hasta aproximadamente 3,5; aproximadamente 1 hasta aproximadamente 3; aproximadamente 1 hasta aproximadamente 2,5; aproximadamente 1 hasta aproximadamente 2; aproximadamente 1 hasta aproximadamente 1,5; aproximadamente 1,5 hasta aproximadamente 7; aproximadamente 1,5 hasta aproximadamente 6,5; aproximadamente 1,5 hasta aproximadamente 6; aproximadamente 1,5 hasta aproximadamente 5,5; aproximadamente 1,5 hasta aproximadamente 5; aproximadamente 1,5 hasta aproximadamente 4,5; aproximadamente 1,5 hasta aproximadamente 4; aproximadamente 1,5 hasta aproximadamente 3,5; aproximadamente 1,5 hasta aproximadamente 3; aproximadamente 1,5 hasta aproximadamente 2,5; aproximadamente 1,5 hasta aproximadamente 2; aproximadamente 2 hasta aproximadamente 7; aproximadamente 2 hasta aproximadamente 6,5; aproximadamente 2 hasta aproximadamente 6; aproximadamente 2 hasta aproximadamente 5,5; aproximadamente 2 hasta aproximadamente 5; aproximadamente 2 hasta aproximadamente 4,5; aproximadamente 2 hasta aproximadamente 4, aproximadamente 2 hasta aproximadamente 3,5; aproximadamente 2 hasta aproximadamente 3; aproximadamente 2 hasta aproximadamente 2,5; aproximadamente 2,5 hasta aproximadamente 7; aproximadamente 2,5 hasta aproximadamente 6,5; aproximadamente 2,5 hasta aproximadamente 6; aproximadamente 2,5 hasta aproximadamente 5,5; aproximadamente 2,5 hasta aproximadamente 5; aproximadamente 2,5 hasta aproximadamente 4,5; aproximadamente 2,5 hasta aproximadamente 4; aproximadamente 2,5 hasta aproximadamente 3,5; aproximadamente 2,5 hasta aproximadamente 3; aproximadamente 3 hasta aproximadamente 7; aproximadamente 3 hasta aproximadamente 6,5; aproximadamente 3 hasta aproximadamente 6; aproximadamente 3 hasta aproximadamente 5,5; aproximadamente 3 hasta aproximadamente 5; aproximadamente 3 hasta aproximadamente 4,5; aproximadamente 3 hasta aproximadamente 4; aproximadamente 3 hasta aproximadamente 3,5; aproximadamente 3,5 hasta aproximadamente 7; aproximadamente 3,5 hasta aproximadamente 6,5; aproximadamente 3,5 hasta aproximadamente 6; aproximadamente 3,5 hasta aproximadamente 5,5; aproximadamente 3,5 hasta aproximadamente 5; aproximadamente 3,5 hasta aproximadamente 4,5; aproximadamente 3,5 hasta aproximadamente 4; aproximadamente 4 hasta aproximadamente 7; aproximadamente 4 hasta aproximadamente 6,5; aproximadamente 4 hasta aproximadamente 6; aproximadamente 4 hasta aproximadamente 5,5; aproximadamente 4 hasta aproximadamente 5; aproximadamente 4 hasta aproximadamente 4,5; aproximadamente 4,5 hasta aproximadamente 7; aproximadamente 4,5 hasta aproximadamente 6,5; aproximadamente 4,5 hasta aproximadamente 6; aproximadamente 4,5 hasta aproximadamente 5,5; aproximadamente 4,5 hasta aproximadamente 5; aproximadamente 5 hasta aproximadamente 7; aproximadamente 5 hasta aproximadamente 6,5; aproximadamente 5 hasta aproximadamente 6; aproximadamente 5 hasta aproximadamente 5,5; aproximadamente 5,5 hasta aproximadamente 7; aproximadamente 5,5 hasta aproximadamente 6,5; aproximadamente 5,5 hasta aproximadamente 6; aproximadamente 6 hasta aproximadamente 7; aproximadamente 6 hasta aproximadamente 6,5; y aproximadamente 6,5 hasta aproximadamente 7.

En algunas realizaciones, se añade un ácido en una cantidad de aproximadamente 2 % a aproximadamente 10 %, aproximadamente 2 % a aproximadamente 9 %, aproximadamente 2 % a aproximadamente 8 %, aproximadamente 2 % a aproximadamente 7 %, aproximadamente 2 % a aproximadamente 6 %, aproximadamente 3 % a aproximadamente 6 %, aproximadamente 4 % a aproximadamente 6 %, aproximadamente 5 % a aproximadamente 6 %, aproximadamente 2 % a aproximadamente 5 %, aproximadamente 2 % a aproximadamente 4 %, aproximadamente 2 % a aproximadamente 3 %, aproximadamente 3 % a aproximadamente 5 %, aproximadamente 3 % a aproximadamente 4 %, o aproximadamente 4 % a aproximadamente 5 % en peso (o volumen) del caldo de células para reducir el pH.

El tratamiento enzimático se refiere a poner en contacto las células con una o más enzimas. Las enzimas incluyen, pero no se limitan a, proteasas, celulasas, hemicelulasas, quitinasas, pectinasas y combinaciones de las mismas. Los ejemplos no limitantes de proteasas incluyen serina proteasas, treonina proteasas, cisteína proteasas, aspartato proteasas, metaloproteasas, ácido glutámico proteasas, alacasa y combinaciones de las mismas. Los ejemplos no limitantes de celulasas incluyen sucrasa, maltasa, lactasa, alfa-glucosidasa, beta-glucosidasa, amilasa, lisozima, neuraminidasa, galactosidasa, alfa-manosidasa, glucuronidasa, hialuronidasa, pululanasa, glucocerebrosidasa, galactosilceramidasa, acetilgalactosaminidasa, fucosidasa, hexosaminidasa, iduronidasa, maltasa-glucoamilasa y combinaciones de las mismas. Un ejemplo no limitante de una quitinasa incluye quitotriosidasa. Los ejemplos no limitantes de pectinasas incluyen pectoliasa, pectozima, poligalacturonasa y combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, algunas enzimas se activan calentando. En algunas realizaciones, la lisis no incluye el uso de enzimas.

Como se usa en el presente documento, una "composición de células lisadas" se refiere a una composición que comprende uno o más células lisadas, que incluye residuo celular y otros contenidos de la célula, en combinación con aceite microbiano (de las células lisadas), y opcionalmente, caldo que contiene líquido (por ejemplo, agua), nutrientes y células microbianas. En algunas realizaciones, una célula microbiana está contenida en un caldo de fermentación o medios que comprenden agua. En algunas realizaciones, una composición de células lisadas se refiere a una composición que comprende una o más células lisadas, residuo celular, aceite microbiano, los contenidos naturales de la célula y componentes acuosos de un caldo de fermentación. En una realización, la composición de células lisadas comprende líquido, residuo celular y aceite microbiano. En algunas realizaciones, una composición de células lisadas está en forma de una emulsión de aceite en agua que comprende una mezcla de una fase acuosa continua y una fase aceitosa dispersada. En algunas realizaciones, una fase aceitosa dispersada está presente en una concentración de aproximadamente 1 % a aproximadamente 60 %; aproximadamente 1 % a aproximadamente 50 %; aproximadamente 1 % a aproximadamente 40 %; aproximadamente 1 % a aproximadamente 30 %; aproximadamente 1 % a aproximadamente 20 %; aproximadamente 5 % a aproximadamente 60 %; aproximadamente 5 % a aproximadamente 50 %; aproximadamente 5 % a aproximadamente 40 %; aproximadamente 5 % a aproximadamente 30 %; aproximadamente 5 % a aproximadamente 20 %; aproximadamente 10 % a aproximadamente 60 %; aproximadamente 10 % a aproximadamente 50 %; aproximadamente 10 % a aproximadamente 40 %; aproximadamente 20 % a aproximadamente 60 %; 20 % a 50 %, 20 % a aproximadamente 40 %; aproximadamente 30 % a aproximadamente 60 %; aproximadamente 30 % a aproximadamente 50 %; o aproximadamente 40 % a aproximadamente 60 % en peso (o volumen) de una composición emulsionada de células lisadas.

En algunas realizaciones, el lisado de las células microbianas da como resultado la formación de una emulsión de materiales endógenos en la célula o biomasa de células que incluye, pero no se limita a, proteínas, fosfolípidos, hidratos de carbono y combinaciones de los mismos. Aunque no se pretende quedar ligado a teoría particular alguna, se cree los procesos de la presente invención desintegran o desemulsionan una composición emulsionada de células lisadas, permitiendo que el aceite microbiano se separe de la composición de células lisadas. Los términos "emulsión" y "emulsionado" se refieren a una mezcla de dos o más fases o capas inmiscibles, en donde una fase o capa se dispersa en otra fase o capa. Los términos "romper", "desintegrar" "desemulsionar", "desemulsión", "desemulsionante" y "rotura" se refieren a un proceso de separar fases o capas inmiscibles de una emulsión. Por ejemplo, desemulsionar o romper una composición emulsionada de células lisadas se refiere a un proceso por el que una composición emulsionada de células lisadas cambia de una emulsión que tiene una o más fases o capas a una composición que tiene dos o más fases o capas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un proceso de la presente invención rompe una composición emulsionada de células lisadas de una monofase en dos o más fases. En algunas realizaciones, las dos o más fases incluyen una fase aceitosa y una fase acuosa. En algunas realizaciones, un proceso de la presente invención rompe una composición emulsionada de células lisadas en al menos tres fases. En algunas realizaciones, las tres fases se seleccionan de una fase aceitosa, una fase acuosa y una fase sólida. En algunas realizaciones, las fases se seleccionan de una fase aceitosa, una fase de emulsión, una fase acuosa y una fase sólida.

El proceso según la invención comprende desemulsionar la composición de células lisadas que comprende reducir el pH de la composición de células lisadas a desde 0,5 hasta 6. En algunas realizaciones, el pH se reduce añadiendo un ácido. Los ácidos incluyen, pero no se limitan a, sulfúrico; fosfórico; clorhídrico; bromhídrico; yodhídrico; hipocloroso; cloroso; clórico; perclórico; fluorosulfúrico; nítrico; fluoroantimónico; fluorobórico; hexafluorofosfórico; crómico; bórico; acético; cítrico; fórmico; y combinaciones de los mismos. El proceso comprende reducir el pH de la composición de células lisadas a desde 0,5 hasta 6. En otras realizaciones, el pH se selecciona desde aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 5,5; aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 5; aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 4,5; aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 4; aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 3,5; aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 3; aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 2,5; aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 2; aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 1,5; aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 1; aproximadamente 1 hasta aproximadamente 6; aproximadamente 1 hasta aproximadamente 5,5; aproximadamente 1 hasta aproximadamente 5; aproximadamente 1 hasta aproximadamente 4,5; aproximadamente 1 hasta aproximadamente 4; aproximadamente 1 hasta aproximadamente 3,5; aproximadamente 1 hasta aproximadamente 3; aproximadamente 1 hasta aproximadamente 2,5; aproximadamente 1 hasta aproximadamente 2; aproximadamente 1 hasta aproximadamente 1,5; aproximadamente 1,5 a aproximadamente 6; aproximadamente 1,5 hasta aproximadamente 5,5; aproximadamente 1,5 hasta aproximadamente 5; aproximadamente 1,5 hasta aproximadamente 4,5; aproximadamente 1,5 hasta aproximadamente 4; aproximadamente 1,5 hasta aproximadamente 3,5; aproximadamente 1,5 hasta aproximadamente 3; aproximadamente 1,5 hasta aproximadamente 2,5; aproximadamente 1,5 hasta aproximadamente 2; aproximadamente 2 hasta aproximadamente 6; aproximadamente 2 hasta aproximadamente 5,5; aproximadamente 2 hasta aproximadamente 5; aproximadamente 2 hasta aproximadamente 4,5; aproximadamente 2 hasta aproximadamente 4, aproximadamente 2 hasta aproximadamente 3,5; aproximadamente 2 hasta aproximadamente 3; aproximadamente 2 hasta aproximadamente 2,5; aproximadamente 2,5 hasta aproximadamente 6; aproximadamente 2,5 hasta aproximadamente 5,5; aproximadamente 2,5 hasta aproximadamente 5; aproximadamente 2,5 hasta aproximadamente 4,5; aproximadamente 2,5 hasta aproximadamente 4; aproximadamente 2,5 hasta aproximadamente 3,5; aproximadamente 2,5 hasta aproximadamente 3; aproximadamente 3 hasta aproximadamente 6; aproximadamente 3 hasta aproximadamente 5,5; aproximadamente 3 hasta aproximadamente 5; aproximadamente 3 hasta aproximadamente 4,5; aproximadamente 3 hasta aproximadamente 4; aproximadamente 3 hasta aproximadamente 3,5; aproximadamente 3,5 hasta aproximadamente

6; aproximadamente 3,5 hasta aproximadamente 5,5; aproximadamente 3,5 hasta aproximadamente 5; aproximadamente 3,5 hasta aproximadamente 4,5; aproximadamente 3,5 hasta aproximadamente 4; aproximadamente 4 hasta aproximadamente 6; aproximadamente 4 hasta aproximadamente 5,5; aproximadamente 4 hasta aproximadamente 5; aproximadamente 4 hasta aproximadamente 4,5; aproximadamente 4,5 hasta aproximadamente 6; aproximadamente 4,5 hasta aproximadamente 5,5; aproximadamente 4,5 hasta aproximadamente 5; aproximadamente 5 hasta aproximadamente 6; aproximadamente 5 hasta aproximadamente 5,5; y aproximadamente 5,5 hasta aproximadamente 6.

En algunas realizaciones, el proceso comprende desemulsionar la composición de células lisadas añadiendo un ácido en una cantidad de desde aproximadamente 0,5 % hasta aproximadamente 20 %, aproximadamente 0,5 % hasta aproximadamente 15 %, aproximadamente 0,5 % hasta aproximadamente 10 %, aproximadamente 0,5 % hasta aproximadamente 9 %, aproximadamente 0,5 % hasta aproximadamente 8 %, aproximadamente 0,5 % hasta aproximadamente 7 %, aproximadamente 0,5 % hasta aproximadamente 6 %, aproximadamente 0,5 % hasta aproximadamente 5 %, aproximadamente 0,5 % hasta aproximadamente 4 %, aproximadamente 0,5 % hasta aproximadamente 3 %, aproximadamente 0,5 % hasta aproximadamente 2 %, y aproximadamente 0,5 % hasta aproximadamente 1 %, en peso (o volumen) del caldo de células o composición de células lisadas. En una realización, el proceso comprende desemulsionar la composición de células lisadas añadiendo un ácido en una cantidad de desde aproximadamente 0,5 % hasta aproximadamente 20 %, en peso, de composición de células lisadas.

En algunas realizaciones, el proceso comprende además calentar antes, durante o después de lisar las células. En algunas realizaciones, el proceso comprende calentar la composición de células lisadas y/o células hasta al menos 10 ºC, al menos 20 ºC, al menos 25 ºC, al menos 30 ºC, al menos 35 ºC, al menos 40 ºC, al menos 45 ºC, al menos 50 ºC, al menos 55 ºC, al menos 60 ºC, al menos 65 ºC, al menos 70 ºC, al menos 75 ºC, al menos 80 ºC, al menos 85 ºC, al menos 90 ºC, al menos 95 ºC, o al menos 100 ºC. En otras realizaciones, el proceso comprende calentar la composición de células lisadas y/o células a desde aproximadamente 10 ºC hasta aproximadamente 100 ºC, aproximadamente 10 ºC hasta aproximadamente 90 ºC, aproximadamente 10 ºC hasta aproximadamente 80 ºC, aproximadamente 10 ºC hasta aproximadamente 70 ºC, aproximadamente 20 ºC hasta aproximadamente 100 ºC, aproximadamente 20 ºC hasta aproximadamente 90 ºC, aproximadamente 20 ºC hasta aproximadamente 80 ºC, aproximadamente 20 ºC hasta aproximadamente 70 ºC, aproximadamente 30 ºC hasta aproximadamente 100 ºC, aproximadamente 30 ºC hasta aproximadamente 90 ºC, aproximadamente 30 ºC hasta aproximadamente 80 ºC, aproximadamente 30 ºC hasta aproximadamente 70 ºC, aproximadamente 40 ºC hasta aproximadamente 100 ºC, aproximadamente 40 ºC hasta aproximadamente 90 ºC, aproximadamente 40 ºC hasta aproximadamente 80 ºC, aproximadamente 50 ºC hasta aproximadamente 100 ºC, aproximadamente 50 ºC hasta aproximadamente 90 ºC, aproximadamente 50 ºC hasta aproximadamente 80 ºC, aproximadamente 50 ºC hasta aproximadamente 70 ºC, aproximadamente 60 ºC hasta aproximadamente 100 ºC, aproximadamente 60 ºC hasta aproximadamente 90 ºC, aproximadamente 60 ºC hasta aproximadamente 80 ºC, aproximadamente 70 ºC hasta aproximadamente 100 ºC, aproximadamente 70 ºC hasta aproximadamente 90 ºC, aproximadamente 80 ºC hasta aproximadamente 100 ºC, aproximadamente 80 ºC hasta aproximadamente 90 ºC, o aproximadamente 90 ºC hasta aproximadamente 100 ºC. En realizaciones adicionales, el proceso comprende calentar la composición de células lisadas desde aproximadamente 70 ºC hasta aproximadamente 100 ºC, aproximadamente 70 ºC hasta aproximadamente 90 ºC, aproximadamente 80 ºC hasta aproximadamente 100 ºC, aproximadamente 80 ºC hasta aproximadamente 90 ºC, o aproximadamente 90 ºC hasta aproximadamente 100 ºC. Aún en realizaciones adicionales, el proceso comprende calentar la composición de células lisadas hasta al menos 70 ºC, al menos 75 ºC, al menos 80 ºC, al menos 85 ºC, al menos 90 ºC, al menos 95 ºC, o al menos 100 ºC. Aún en realizaciones adicionales, el proceso comprende además calentar la composición de células lisadas hasta al menos 70 ºC. En otra realización más, el proceso comprende además calentar la composición de células lisadas a desde aproximadamente 70 ºC hasta aproximadamente 100 ºC.

En algunas realizaciones, el proceso comprende además calentar la composición de células lisadas hasta que la composición de células lisadas comprenda un tamaño medio de partículas seleccionado de 5 micrómetros a 25 micrómetros; 5 micrómetros a 20 micrómetros; 5 micrómetros a 15 micrómetros; 10 micrómetros a 25 micrómetros; 10 micrómetros a 20 micrómetros; 10 micrómetros a 15 micrómetros; 15 micrómetros a 25 micrómetros; 15 micrómetros a 20 micrómetros; y 20 micrómetros a 25 micrómetros. En una realización adicional, el tamaño medio de partículas de la composición de células lisadas se selecciona de 25 micrómetros o menos, 20 micrómetros o menos, 15 micrómetros o menos, 10 micrómetros o menos y 5 micrómetros o menos. En una realización adicional, el tamaño medio de partículas de la composición de células lisadas es 25 micrómetros o menos. En algunas realizaciones, el tamaño medio de partículas se puede medir usando, por ejemplo, un analizador del tamaño de partículas Beckman Coulter LS 13 320 (Beckman Coulter, Brea, CA). En algunas realizaciones, el tamaño medio de partículas se puede medir usando, por ejemplo, un analizador del tamaño de partículas Malvern MS2000 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido). En algunas realizaciones, la composición de células lisadas se calienta durante un periodo de tiempo suficiente para desemulsionar la composición de células lisadas.

En algunas realizaciones, las células y/o una composición de células lisadas se pueden calentar en un sistema cerrado o en un sistema con un evaporador. En algunas realizaciones, las células y/o composición de células lisadas se pueden calentar en un sistema con un evaporador tal que una porción del agua presente en las células y/o la composición de células lisadas se retiren por evaporación. En algunas realizaciones, un proceso comprende calentar células y/o una composición de células lisadas en un sistema con un evaporador para retirar hasta 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 % o 50 % en peso (o volumen) de agua presente en las células y/o la composición de células

lisadas. En algunas realizaciones, un proceso comprende calentar células y/o una composición de células lisadas en un sistema con un evaporador para retirar 1 % a 50 %, 1 % a 45 %, 1 % a 40 %, 1 % a 35 %, 1 % a 30 %, 1 % a 25 %, 1 % a 20 %, 1 % a 15 %, 1 % a 10 %, 1 % a 5 %, 5 % a 50 %, 5 % a 45 %, 5 % a 40 %, 5 % a 35 %, 5 % a 30 %, 5 % a 25 %, 5 % a 20 %, 5 % a 15 %, 5 % a 10 %, 10 % a 50 %, 10 % a 45 %, 10 % a 40 %, 10 % a 35 %, 10 % a 30 %, 10 % a 25 %, 10 % a 20 %, 10 % a 15 %, 15 % a 50 %, 15 % a 45 %, 15 % a 40 %, 15 % a 35 %, 15 % a 30 %, 15 % a 25 %, 15 % a 20 %, 20 % a 50 %, 20 % a 45 %, 20 % a 40 %, 20 % a 35 %, 20 % a 30 %, 20 % a 25 %, 25 % a 50 %, 25 % a 45 %, 25 % a 40 %, 25 % a 35 %, 25 % a 30 %, 30 % a 50 %, 30 % a 45 %, 30 % a 40 %, 30 % a 35 %, 35 % a 50 %, 35 % a 45 %, 35 % a 40 %, 40 % a 50 %, 40 % a 45 %, o 45 % a 50 % en peso (o volumen) de agua.

En algunas realizaciones, el proceso comprende además añadir un emulsionante a una composición de células lisadas. En algunas realizaciones, el emulsionante es un detergente. En algunas realizaciones, el emulsionante es un tensioactivo. En algunas realizaciones, el emulsionante se añade antes, durante o después de la lisis. En una realización, el emulsionante se añade después de la lisis. En algunas realizaciones, el emulsionante se añade a la composición de células lisadas. Como se usa en el presente documento, el término "emulsionante" se refiere a una sustancia que estabiliza una emulsión. Los emulsionantes se seleccionan de emulsionantes iónicos, emulsionantes no iónicos y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el emulsionante es un emulsionante iónico.

En algunas realizaciones, el emulsionante iónico se selecciona de emulsionantes aniónicos, emulsionantes catiónicos y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, los emulsionantes aniónicos pueden ser emulsionantes aniónicos de sulfato, tales como, por ejemplo, alquilsulfatos (por ejemplo, laurilsulfato de amonio, laurilsulfato de sodio (SLS)/dodecilsulfato de sodio (SDS) y combinaciones de los mismos), alquil éter sulfatos (por ejemplo, laureth sulfato de sodio / lauril éter sulfato de sodio, miristil éter sulfato de sodio y combinaciones de los mismos) y combinaciones de los mismos; emulsionantes aniónicos de sulfonato, tales como, por ejemplo, docusatos (por ejemplo, dioctilsulfosuccinato de sodio, fluorotensioactivos de sulfonato (por ejemplo, perfluorooctanosulfonato y perfluorobutanosulfonato), alquilbencenosulfonatos y combinaciones de los mismos); emulsionantes aniónicos de fosfato (por ejemplo, alquil aril éter fosfato, alquil éter fosfato y combinaciones de los mismos); emulsionantes aniónicos de carboxilato (por ejemplo, alquilcarboxilatos (por ejemplo, estearato de sodio, lauroilsarcosinato de sodio, fluorotensioactivos de carboxilato (por ejemplo, perfluorononanoato, perfluorooctanoato y combinaciones de los mismos) y combinaciones de los mismos); y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el emulsionante es un emulsionante aniónico. En una realización, el emulsionante aniónico se selecciona de un emulsionante aniónico de sulfato, un emulsionante aniónico de sulfonato, un emulsionante aniónico de fosfato, un emulsionante aniónico de carboxilato y combinaciones de los mismos. En otra realización, un emulsionante aniónico es un emulsionante aniónico de sulfato. Aún en una realización adicional, un emulsionante aniónico de sulfato se selecciona de laurilsulfato de amonio, dodecilsulfato de sodio, laureth sulfato de sodio, lauril éter sulfato de sodio, miristil éter sulfato de sodio y combinaciones de los mismos. Aún en una realización incluso adicional, un emulsionante aniónico de sulfato es dodecilsulfato de sodio.

En algunas realizaciones, el emulsionante catiónico puede ser una amina primaria dependiente del pH; una amina secundaria dependiente del pH; una amina terciaria dependiente del pH; diclorhidrato de octenidina; un catión de amonio cuaternario permanentemente cargado (por ejemplo, sales de alquiltrimetilamonio (por ejemplo, bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB)/bromuro de hexadeciltrimetilamonio, cloruro de cetiltrimetilamonio (CTAC) y combinaciones de los mismos), cloruro de cetilpiridinio (CPC), cloruro de benzalconio (BAC), cloruro de bencetonio (BZT), 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxano, cloruro de dimetildioctadecilamonio, bromuro de dioctadecildimetilamonio (DODAB) y combinaciones de los mismos); y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, el peso molecular del emulsionante se selecciona de 500 g/mol o menos, 450 g/mol o menos, 400 g/mol o menos, 350 g/mol o menos y 300 g/mol o menos. En una realización adicional, el peso molecular del emulsionante se selecciona de 250 g/mol a 500 g/mol, 250 g/mol a 450 g/mol, 250 g/mol a 400 g/mol, 250 g/mol a 350 g/mol, 250 g/mol a 300 g/mol, 300 g/mol a 500 g/mol, 300 g/mol a 450 g/mol, 300 g/mol a 400 g/mol, 300 g/mol a 350 g/mol, 350 g/mol a 500 g/mol, 350 g/mol a 450 g/mol, 350 g/mol a 400 g/mol, 400 g/mol a 500 g/mol, 400 g/mol a 450 g/mol y 450 g/mol a 500 g/mol. Por ejemplo, el peso molecular de SDS es 288 g/mol y el peso molecular de CTAB es 364 g/mol. Aún en una realización adicional, el peso molecular del emulsionante se selecciona de 250 g/mol a 450 g/mol, 250 g/mol a 400 g/mol, 250 g/mol a 350 g/mol y 250 g/mol a 300 g/mol.

En algunas realizaciones, se añade un emulsionante como un polvo. En algunas realizaciones, se añade un emulsionante en una disolución que tiene una concentración de emulsionante en una cantidad de 5 % a 50 %, 5 % a 45 %, 5 % a 40 %, 5 % a 35 %, 5 % a 30 %, 10 % a 50 %, 10 % a 45 %, 10 % a 40 %, 10 % a 35 %, 10 % a 30 %, 15 % a 50 %, 15 % a 45 %, 15 % a 40 %, 15 % a 35 %, 15 % a 30 %, 20 % a 50 %, 20 % a 45 %, 20 % a 40 %, 20 % a 35 %, 20 % a 30 %, 25 % a 50 %, 25 % a 45 %, 25 % a 40 %, 25 % a 35 %, 25 % a 30 %, 30 % a 50 %, 30 % a 45 %, 30 % a 40 % y 30 % a 35 %.

En algunas realizaciones, se añade un emulsionante (por ejemplo, en forma de polvo o en disolución) en una cantidad seleccionada de 0,2 % a 10 %, 0,2 % a 9,5 %, 0,2 % a 9 %, 0,2 % a 8,5 %, 0,2 % a 8 %, 0,2 % a 7,5 %, 0,2 % a 7 %, 0,2 % a 6,5 %, 0,2 % a 6 %, 0,2 % a 5,5 %, 0,2 % a 5 %, 0,2 % a 4,5 %, 0,2 % a 4 %, 0,2 % a 3,5 %, 0,2 % a 3 %, 0,2 % a 2,5 %, 0,2 % a 2 %, 0,2 % a 1,5 %, 0,2 % a 1 %, 0,2 % a 0,5 %, 0,5 % a 10 %, 0,5 % a 9,5 %, 0,5 % a 9 %, 0,5 % a 8,5 %, 0,5 % a 8 %, 0,5 % a 7,5 %, 0,5 % a 7 %, 0,5 % a 6,5 %, 0,5 % a 6 %, 0,5 % a 5,5 %, 0,5 % a 5 %, 0,5 % a 4,5 %, 0,5 % a 4 %, 0,5 % a 3,5 %, 0,5 % a 3 %, 0,5 % a 2,5 %, 0,5 % a 2 %, 0,5 % a 1,5 %, 0,5 % a 1 %, 1 %

a 10 %, 1 % a 9,5 %, 1 % a 9 %, 1 % a 8,5 %, 1 % a 8 %, 1 % a 7,5 %, 1 % a 7 %, 1 % a 6,5 %, 1 % a 6 %, 1 % a 5,5 %, 1 % a 5 %, 1 % a 4,5 %, 1 % a 4 %, 1 % a 3,5 %, 1 % a 3 %, 1 % a 2,5 %, 1 % a 2 %, 1 % a 1,5 %, 1,5 % a 10 %, 1,5 % a 9,5 %, 1,5 % a 9 %, 1,5 % a 8,5 %, 1,5 % a 8 %, 1,5 % a 7,5 %, 1,5 % a 7 %, 1,5 % a 6,5 %, 1,5 % a 6 %, 1,5 % a 5,5 %, 1,5 % a 5 %, 1,5 % a 4,5 %, 1,5 % a 4 %, 1,5 % a 3,5 %, 1,5 % a 3 %, 1,5 % a 2,5 %, 1,5 % a 2 %, 2 % a 10 %, 2 % a 9,5 %, 2 % a 9 %, 2 % a 8,5 %, 2 % a 8 %, 2 % a 7,5 %, 2 % a 7 %, 2 % a 6,5 %, 2 % a 6 %, 2 % a 5,5 %, 2 % a 5 %, 2 % a 4,5 %, 2 % a 4 %, 2 % a 3,5 %, 2 % a 3 %, 2 % a 2,5 %, 2,5 % a 10 %, 2,5 % a 9,5 %, 2,5 % a 9 %, 2,5 % a 8,5 %, 2,5 % a 8 %, 2,5 % a 7,5 %, 2,5 % a 7 %, 2,5 % a 6,5 %, 2,5 % a 6 %, 2,5 % a 5,5 %, 2,5 % a 5 %, 2,5 % a 4,5 %, 2,5 % a 4 %, 2,5 % a 3,5 %, 2,5 % a 3 %, 3 % a 10 %, 3 % a 9,5 %, 3 % a 9 %, 3 % a 8,5 %, 3 % a 8 %, 3 % a 7,5 %, 3 % a 7 %, 3 % a 6,5 %, 3 % a 6 %, 3 % a 5,5 %, 3 % a 5 %, 3 % a 4,5 %, 3 % a 4 % y 3 % a 3,5 % en peso (o volumen) del caldo de fermentación o composición de células lisadas. En otra realización, se añade un emulsionante (por ejemplo, en forma de polvo o en disolución) en una cantidad seleccionada de 0,2 % a 5 %, 0,5 % a 5 %, 1 % a 5 %, 1,5 % a 5 %, 2 % a 5 %, 2,5 % a 5 % y 3 % a 5 % en peso (o volumen) del caldo de fermentación o composición de células lisadas. Aún en una realización adicional, se añade un emulsionante en una cantidad de desde 0,2 % hasta 10 % en peso de la composición de células lisadas.

En algunas realizaciones, el emulsionante disminuye la tensión interfacial (es decir, tensión superficial) del caldo de fermentación o composición de células lisadas. Como se usa en el presente documento, el término "tensión interfacial" o "tensión superficial" se refiere a la fuerza que actúa sobre una línea imaginaria un metro de longitud en la interface entre dos fases. En algunas realizaciones, la tensión interfacial de la emulsión formada por el emulsionante es inferior a una emulsión formada por los materiales endógenos. En algunas realizaciones, la tensión interfacial se puede medir en dinas/cm.

En algunas realizaciones, el emulsionante aumenta un valor absoluto del potencial zeta del caldo de fermentación o composición de células lisadas (es decir, aumenta un potencial zeta positivo o disminuye un potencial zeta negativo). En algunas realizaciones, la adición de un emulsionante aniónico puede dar como resultado un desplazamiento hacia abajo en el potencial zeta del caldo de fermentación o composición de células lisadas (por ejemplo, disminuye un potencial zeta positivo o aumenta un potencial zeta negativo). En algunas realizaciones, la adición de un emulsionante catiónico puede dar como resultado un desplazamiento hacia arriba en el potencial zeta del caldo de fermentación o composición de células lisadas (por ejemplo, aumenta un potencial zeta positivo o aumenta un potencial zeta negativo). Como se usa en el presente documento, el término "potencial zeta" se refiere al potencial electrocinético entre partículas en la emulsión. En algunas realizaciones, el potencial zeta se puede medir en mV. En algunas realizaciones, el valor absoluto del potencial zeta de la emulsión formada por el emulsionante es superior a una emulsión formada por los materiales endógenos.

En algunas realizaciones, la adición de un emulsionante iónico crea una emulsión de aceite en agua. En algunas realizaciones, la emulsión de aceite en agua incluye, pero no se limita a, aceite, agua y un emulsionante iónico.

En algunas realizaciones, el proceso comprende además añadir una sal a la composición de células lisadas. El término "sal" se refiere a un compuesto iónico formado reemplazando un ion hidrógeno de un ácido con un metal (por ejemplo, un metal alcalino, un metal alcalinotérreo y un metal de transición) o un compuesto positivamente cargado (por ejemplo, NH_4^+). En algunas realizaciones, la sal puede ser una sal de metal alcalino, sales de metales alcalinotérreos, sales de sulfato o combinaciones de las mismas. Las especies iónicas negativamente cargadas presentes en una sal incluyen, pero no se limitan a, haluros, sulfato, bisulfato, sulfito, fosfato, hidrogenofosfato, dihidrogenofosfato, carbonato, bicarbonato y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, una sal se selecciona de cloruro sódico, sulfato de sodio, carbonato sódico, cloruro de calcio, sulfato de potasio, sulfato de magnesio, glutamato de monosodio, sulfato de amonio, cloruro de potasio, cloruro de hierro, sulfato de hierro, sulfato de aluminio, acetato de amonio y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, una sal no incluye NaOH. Se puede añadir una sal como un sólido (por ejemplo, en forma cristalina, amorfa, peletizada y/o granular), y/o como una disolución (por ejemplo, una disolución diluida, una disolución saturada o una disolución super-saturada) que contiene, por ejemplo, agua.

En algunas realizaciones, la sal se añade en una cantidad de 5 g/L a 25 g/L, 5 g/L a 10 g/L, 10 g/L a 15 g/L, 15 g/L a 20 g/L, 20 g/L a 25 g/L, o 10 g/L a 20 g/L.

En otras realizaciones, una sal se añade a la composición de células lisadas en una cantidad de 20 % o menos, 15 % o menos, 10 % o menos, 7,5 % o menos, 5 % o menos, o 2 % o menos en peso (o volumen), de la composición de células lisadas. En algunas realizaciones, una sal se añade a la composición de células lisadas en una cantidad de desde aproximadamente 0,05 % hasta aproximadamente 20 %, aproximadamente 0,1 % hasta aproximadamente 20 %, aproximadamente 0,1 % hasta aproximadamente 15 %, aproximadamente 0,1 % hasta aproximadamente 10 %, aproximadamente 0,5 % hasta aproximadamente 20 %, aproximadamente 0,5 % hasta aproximadamente 15 %, aproximadamente 0,5 % hasta aproximadamente 10 %, aproximadamente 0,5 % hasta aproximadamente 5 %, aproximadamente 0,5 % hasta aproximadamente 4 %, aproximadamente 0,5 % hasta aproximadamente 3 %, aproximadamente 0,5 % hasta aproximadamente 2,5 %, aproximadamente 0,5 % hasta aproximadamente 2 %, aproximadamente 0,5 % hasta aproximadamente 1,5 %, aproximadamente 0,5 % hasta aproximadamente 1 %, aproximadamente 1 % hasta aproximadamente 20 %, aproximadamente 1 % hasta aproximadamente 15 %, aproximadamente 1 % hasta aproximadamente 10 %, aproximadamente 1 % hasta aproximadamente 5 %, aproximadamente 1 % hasta aproximadamente 4 %, 1 % hasta aproximadamente 3 %, aproximadamente 1 % hasta

aproximadamente 2,5 %, aproximadamente 1 % hasta aproximadamente 2 %, aproximadamente 1 % hasta aproximadamente 1,5 %, aproximadamente 1,5 % hasta aproximadamente 5 %, aproximadamente 1,5 % hasta aproximadamente 4 %, aproximadamente 1,5 % hasta aproximadamente 3 %, aproximadamente 1,5 % hasta aproximadamente 2,5 %, aproximadamente 1,5 % hasta aproximadamente 2 %, aproximadamente 2 % hasta 20 %, aproximadamente 2 % hasta aproximadamente 15 %, aproximadamente 2 % hasta aproximadamente 10 %, aproximadamente 2 % hasta aproximadamente 5 %, aproximadamente 2 % hasta aproximadamente 4 %, aproximadamente 2 % hasta aproximadamente 3 %, aproximadamente 2 % hasta aproximadamente 2,5 %, aproximadamente 2,5 % hasta aproximadamente 5 %, aproximadamente 2,5 % hasta aproximadamente 4 %, aproximadamente 2,5 % hasta aproximadamente 3 %, aproximadamente 3 % hasta aproximadamente 5 %, aproximadamente 3 % hasta aproximadamente 4 %, aproximadamente 4 % hasta aproximadamente 5 %, aproximadamente 5 % hasta aproximadamente 20 %, aproximadamente 5 % hasta aproximadamente 15 %, aproximadamente 5 % hasta aproximadamente 10 %, aproximadamente 10 % hasta aproximadamente 20 %, aproximadamente 10 % hasta aproximadamente 15 %, o aproximadamente 15 % hasta aproximadamente 20 %, en peso (o volumen), de la composición de células lisadas (por ejemplo, hasta el peso total caldo (o volumen)). Por ejemplo, cuando una composición de células lisadas pesa 1.000 kg, la sal que se añade en una cantidad de 0,5 % a 20 %, en peso (o volumen), requiere la adición de 5 kg a 200 kg de sal a la composición de células lisadas. En algunas realizaciones, una sal se añade a la composición de células lisadas en una cantidad de desde aproximadamente 0,05 % hasta aproximadamente 20 %, aproximadamente 0,1 % hasta aproximadamente 20 % en peso (o volumen), aproximadamente 0,5 % hasta aproximadamente 15 % en peso (o volumen) o aproximadamente 2 % hasta aproximadamente 10 % en peso (o volumen) de la composición de células lisadas.

En algunas realizaciones, el proceso comprende además agitar (i) antes, durante o después de lisar las células; (i) antes, durante o después de desemulsionar la composición de células lisadas; o una combinación de los mismos. Los términos "agitar" y "agitación" se refieren a un proceso de afectar el movimiento en las células y/o la composición de células lisadas mediante la aplicación de fuerza. En algunas realizaciones, el proceso comprende agitar las células y/o la composición de células lisadas removiendo, mezclando, combinando, sacudiendo, vibrando, o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, el agitador es un agitador de estilo dispersión que dispersa una base y/o sal en la composición de células o la composición de células lisadas. En algunas realizaciones, el agitador tiene una placa calefactora. En algunas realizaciones, el agitador tiene una manta para la agitación. En algunas realizaciones, un agitador tiene uno o más impulsores. Como se usa en el presente documento, "impulsor" se refiere a un dispositivo dispuesto para conferir movimiento a una composición de células o una composición de células lisadas cuando gira. Los impulsores adecuados para su uso con la presente invención incluyen impulsores de aspas rectas, impulsores de paletas Rushton, impulsores de flujo axial, impulsores de flujo radial, impulsores de disco de aspas cóncavas, impulsores de alta eficiencia, hélices, palas, turbinas y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, la invención comprende agitar a 10 rpm o menos, 20 rpm o menos, 50 rpm o menos, 100 rpm o menos, 150 rpm o menos, 200 rpm o menos, 250 rpm o menos, 300 rpm o menos, 350 rpm o menos, 400 rpm o menos, 10 rpm a 400 rpm, 10 rpm a 350 rpm, 10 rpm a 300 rpm, 10 rpm a 250 rpm, 10 rpm a 200 rpm, 10 rpm a 150 rpm, 10 rpm a 100 rpm, 10 rpm a 50 rpm, 10 rpm a 20 rpm, 20 rpm a 400 rpm, 20 rpm a 350 rpm, 20 rpm a 300 rpm, 20 rpm a 250 rpm, 20 rpm a 200 rpm, 20 rpm a 150 rpm, 20 rpm a 100 rpm, 20 rpm a 50 rpm, 50 rpm a 400 rpm, 50 rpm a 350 rpm, 50 rpm a 300 rpm, 50 rpm a 250 rpm, 50 rpm a 200 rpm, 50 rpm a 150 rpm, 50 rpm a 100 rpm, 100 rpm a 400 rpm, 100 rpm a 350 rpm, 100 rpm a 300 rpm, 100 rpm a 250 rpm, 100 rpm a 200 rpm, 100 rpm a 150 rpm, 150 rpm a 400 rpm, 150 rpm a 350 rpm, 150 rpm a 300 rpm, 150 rpm a 250 rpm, 150 rpm a 200 rpm, 200 rpm a 400 rpm, 200 rpm a 350 rpm, 200 rpm a 300 rpm, 200 rpm a 250 rpm, 250 rpm a 400 rpm, 250 rpm a 350 rpm, 250 rpm a 300 rpm, 300 rpm a 400 rpm, 300 rpm a 350 rpm o 350 rpm a 400 rpm. En algunas realizaciones, la agitación ocurre a una tasa de 350 rpm o menos.

En algunas realizaciones, un proceso incluye agitar las células y/o una composición de células lisadas usando un agitador que tiene una velocidad de la punta del impulsor de 5 cm/s a 900 cm/s, 5 cm/s a 750 cm/s, 5 cm/s a 500 cm/s, 5 cm/s a 350 cm/s, 5 cm/s a 300 cm/s, 5 cm/s a 250 cm/s, 5 cm/s a 200 cm/s, 5 cm/s a 150 cm/s, 5 cm/s a 100 cm/s, 5 cm/s a 50 cm/s, 5 cm/s a 25 cm/s, 25 cm/s a 900 cm/s, 25 cm/s a 750 cm/s, 25 cm/s a 500 cm/s, 25 cm/s a 350 cm/s, 25 cm/s a 300 cm/s, 25 cm/s a 250 cm/s, 25 cm/s a 200 cm/s, 25 cm/s a 150 cm/s, 25 cm/s a 100 cm/s, 25 cm/s a 50 cm/s, 50 cm/s a 900 cm/s, 50 cm/s a 750 cm/s, 50 cm/s a 500 cm/s, 50 cm/s a 350 cm/s, 50 cm/s a 300 cm/s, 50 cm/s a 250 cm/s, 50 cm/s a 200 cm/s, 50 cm/s a 150 cm/s, 50 cm/s a 100 cm/s, 100 cm/s a 900 cm/s, 100 cm/s a 750 cm/s, 100 cm/s a 500 cm/s, 100 cm/s a 350 cm/s, 100 cm/s a 300 cm/s, 100 cm/s a 250 cm/s, 100 cm/s a 200 cm/s, 100 cm/s a 150 cm/s, 150 cm/s a 900 cm/s, 150 cm/s a 750 cm/s, 150 cm/s a 500 cm/s, 150 cm/s a 350 cm/s, 150 cm/s a 300 cm/s, 150 cm/s a 250 cm/s, 150 cm/s a 200 cm/s, 200 cm/s a 900 cm/s, 200 cm/s a 750 cm/s, 200 cm/s a 500 cm/s, 200 cm/s a 350 cm/s, 200 cm/s a 300 cm/s, 200 cm/s a 250 cm/s, 250 cm/s a 900 cm/s, 250 cm/s a 750 cm/s, 250 cm/s a 500 cm/s, 250 cm/s a 350 cm/s, 250 cm/s a 300 cm/s, 300 cm/s a 900 cm/s, 300 cm/s a 750 cm/s, 300 cm/s a 500 cm/s, 300 cm/s a 350 cm/s, 350 cm/s a 900 cm/s, 350 cm/s a 850 cm/s, 350 cm/s a 800 cm/s, 350 cm/s a 750 cm/s, 350 cm/s a 700 cm/s, 350 cm/s a 650 cm/s, 350 cm/s a 600 cm/s, 350 cm/s a 550 cm/s, 350 cm/s a 500 cm/s, 350 cm/s a 450 cm/s, 350 cm/s a 400 cm/s, 400 cm/s a 900 cm/s, 400 cm/s a 850 cm/s, 400 cm/s a 800 cm/s, 400 cm/s a 750 cm/s, 400 cm/s a 700 cm/s, 400 cm/s a 650 cm/s, 400 cm/s a 600 cm/s, 400 cm/s a 550 cm/s, 400 cm/s a 500 cm/s, 400 cm/s a 450 cm/s, 450 cm/s a 900 cm/s, 450 cm/s a 850 cm/s, 450 cm/s a 800 cm/s, 450 cm/s a 750 cm/s, 450 cm/s a 700 cm/s, 450 cm/s a

650 cm/s, 450 cm/s a 600 cm/s, 450 cm/s a 550 cm/s, 450 cm/s a 500 cm/s, 500 cm/s a 900 cm/s, 500 cm/s a 850 cm/s, 500 cm/s a 800 cm/s, 500 cm/s a 750 cm/s, 500 cm/s a 700 cm/s, 500 cm/s a 650 cm/s, 500 cm/s a 600 cm/s, 500 cm/s a 550 cm/s, 550 cm/s a 900 cm/s, 550 cm/s a 850 cm/s, 550 cm/s a 800 cm/s, 550 cm/s a 750 cm/s, 550 cm/s a 700 cm/s, 550 cm/s a 650 cm/s, 550 cm/s a 600 cm/s, 600 cm/s a 900 cm/s, 600 cm/s a 850 cm/s, 600 cm/s a 800 cm/s, 600 cm/s a 750 cm/s, 600 cm/s a 700 cm/s, 600 cm/s a 650 cm/s, 650 cm/s a 900 cm/s, 650 cm/s a 850 cm/s, 650 cm/s a 800 cm/s, 650 cm/s a 750 cm/s, 650 cm/s a 700 cm/s, 700 cm/s a 900 cm/s, 700 cm/s a 850 cm/s, 700 cm/s a 800 cm/s, 700 cm/s a 750 cm/s, 750 cm/s a 900 cm/s, 750 cm/s a 850 cm/s, 750 cm/s a 800 cm/s, 800 cm/s a 900 cm/s, 800 cm/s a 850 cm/s, o 850 cm/s a 900 cm/s. El término "velocidad de la punta del impulsor" se refiere a la velocidad de la parte más externa del impulsor a medida que gira alrededor de su eje central.

En algunas realizaciones, la agitación (y etapas adicionales opcionales son como se describen en el presente documento) se realiza en un recipiente que comprende un impulsor, en donde una relación entre el diámetro del impulsor y el volumen del recipiente es 0,1 a 0,5, 0,1 a 0,4, 0,2 a 0,5, 0,2 a 0,4, 0,3 a 0,5, o 0,3 a 0,4.

En algunas realizaciones, la agitación (y etapas adicionales opcionales como se describen en el presente documento) se realiza en un recipiente que comprende un impulsor, en donde una relación entre el diámetro del impulsor y el diámetro interno del recipiente es al menos 0,25, al menos 0,34, al menos 0,65, 0,25 a 0,65, 0,25 a 0,33, 0,3 a 0,6, 0,3 a 0,5, 0,3 a 0,4, 0,34 a 0,65, 0,34 a 0,6, 0,34 a 0,55, 0,37 a 0,55, 0,4 a 0,65, 0,4 a 0,6, 0,4 a 0,5, o 0,42 a 0,55.

En algunas realizaciones, la agitación comprende mezclar células y/o una composición de células lisadas de forma que las células y/o la composición de células lisadas se pongan en las condiciones de flujo descritas por un número de Reynolds de 10 a 10.000, 1.000 a 10.000, 1,500 a 10.000, o 2.000 a 10.000. En algunas realizaciones, una emulsión de células lisadas durante la agitación tiene un número de Reynolds de 2.000 o más, 3.000 o más, o 5.000 o más, o 2.000 a 10.000, 3.000 a 10.000, o 5.000 a 10.000.

En algunas realizaciones, los recipientes de agitación pueden tener dos impulsores. En algunas realizaciones, los impulsores son impulsores de paletas Rushton. En algunas realizaciones, los impulsores se separan entre sí una distancia al menos igual a un diámetro del impulsor más pequeño. En algunas realizaciones, los impulsores tienen 30 pulgadas a 40 pulgadas (76,2 a 101,6 cm), 33 pulgadas a 37 pulgadas (83,82 a 93,98 cm), 33 pulgadas (83,82 cm), 34 pulgadas (86,36 cm), 35 pulgadas (88,9 cm), 36 pulgadas (91,44 cm) o 37 pulgadas (93,98 cm) de punta a punta. En algunas realizaciones, los recipientes de agitación tienen un volumen de al menos 10.000 litros, al menos 20.000 litros, al menos 30.000 litros, al menos 40.000 litros o al menos 50.000 litros. En algunas realizaciones, los recipientes de agitación tienen un diámetro interno de 90 pulgadas a 110 pulgadas (228,6 a 279,4 cm), 95 pulgadas a 105 pulgadas (241,3 a 266,7 cm), 98 pulgadas (248,92 cm), 99 pulgadas (251,46 cm), 100 pulgadas (254 cm), 101 pulgadas (256,54 cm) o 102 pulgadas (259,08 cm). En algunas realizaciones, un primer impulsor está situado 15 pulgadas a 20 pulgadas (38,1 a 50,8 cm), 16 pulgadas a 19 pulgadas (40,64 a 48,26 cm) o 17 pulgadas a 18 pulgadas (43,18 a 45,72 cm) desde el fondo de un agitación recipiente y un segundo impulsor está situado 60 pulgadas a 80 pulgadas (152,4 a 203,2 cm), 65 pulgadas a 75 pulgadas (165,1 a 190,5 cm), 68 pulgadas (172,72 cm), 69 pulgadas (175,26 cm), 70 pulgadas (177,8 cm), 71 pulgadas (180,34 cm), 72 pulgadas (182,88 cm), 73 pulgadas (185,42 cm), 74 pulgadas (187,96 cm) o 75 pulgadas (190,5 cm) por encima del primer impulsor. En algunas realizaciones, una composición de células lisadas se agita a al menos 50 rpm, al menos 60 rpm o al menos 70 rpm. En algunas realizaciones, una composición de células lisadas se agita a 50 rpm a 70 rpm, 50 rpm a 60 rpm, o 60 rpm a 70 rpm.

En algunas realizaciones, el proceso comprende además agitar la composición de células lisadas. En algunas realizaciones, el proceso de agitar una composición de células lisadas desemulsiona la composición de células lisadas.

En algunas realizaciones, el tamaño medio de partículas de las gotitas de aceite formadas durante la desemulsión se selecciona de 5 micrómetros a 50 micrómetros; 5 micrómetros a 45 micrómetros; 5 micrómetros a 40 micrómetros; 5 micrómetros a 35 micrómetros; 5 micrómetros a 30 micrómetros; 5 micrómetros a 25 micrómetros; 5 micrómetros a 20 micrómetros; 5 micrómetros a 15 micrómetros; 10 micrómetros a 50 micrómetros; 10 micrómetros a 45 micrómetros; 10 micrómetros a 40 micrómetros; 10 micrómetros a 35 micrómetros; 10 micrómetros a 30 micrómetros; 10 micrómetros a 25 micrómetros; 10 micrómetros a 20 micrómetros; 10 micrómetros a 15 micrómetros; 15 micrómetros a 50 micrómetros; 15 micrómetros a 45 micrómetros; 15 micrómetros a 40 micrómetros; 15 micrómetros a 35 micrómetros; 15 micrómetros a 30 micrómetros; 15 micrómetros a 25 micrómetros; 15 micrómetros a 20 micrómetros; 20 micrómetros a 50 micrómetros; 20 micrómetros a 45 micrómetros; 20 micrómetros a 40 micrómetros; 20 micrómetros a 35 micrómetros; 20 micrómetros a 30 micrómetros; 20 micrómetros a 25 micrómetros; 25 micrómetros a 50 micrómetros; 25 micrómetros a 45 micrómetros; 25 micrómetros a 40 micrómetros; 25 micrómetros a 35 micrómetros; 25 micrómetros a 30 micrómetros; 30 micrómetros a 50 micrómetros; 30 micrómetros a 45 micrómetros; 30 micrómetros a 40 micrómetros; 30 micrómetros a 35 micrómetros; 35 micrómetros a 50 micrómetros; 35 micrómetros a 45 micrómetros; 35 micrómetros a 40 micrómetros; 40 micrómetros a 50 micrómetros; 40 micrómetros a 45 micrómetros; y 45 micrómetros a 50 micrómetros. En una realización adicional, el tamaño medio de partículas de las gotitas de aceite formadas durante la desemulsión se selecciona de al menos 10 micrómetros, al menos 15 micrómetros, al menos 20 micrómetros, al menos 25 micrómetros, al menos 30 micrómetros, al menos 35 micrómetros y al menos 40 micrómetros o superior. En realizaciones adicionales, el tamaño medio de partículas de las gotitas de aceite formadas durante la desemulsión se selecciona de al menos 10 micrómetros, al menos

15 micrómetros, al menos 20 micrómetros y al menos 25 micrómetros. En algunas realizaciones, el tamaño medio de partículas se puede medir usando, por ejemplo, un analizador del tamaño de partículas de Beckman Coulter LS 13 320 (Beckman Coulter, Brea, CA). En algunas realizaciones, el tamaño medio de partículas se puede medir usando, por ejemplo, un analizador del tamaño de partículas Malvern MS2000 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido).

En algunas realizaciones, la composición de células lisadas se somete a uno o más de un emulsionante, un ácido, una sal, calor y agitación para formar una composición desemulsionada de células lisadas.

En algunas realizaciones, el proceso comprende además combinar juntas las etapas de lisado y desemulsión para formar una etapa de lisado y desemulsionado de una etapa.

En algunas realizaciones, el proceso comprende además combinar juntas las etapas de lisado y desemulsión para formar una etapa de lisado y desemulsión de una etapa que comprende elevar el pH de las células y la composición de células lisadas. En algunas realizaciones, la etapa de lisado y desemulsión de una etapa comprende elevar el pH de las células y la composición de células lisadas a aproximadamente 8 o superior. En algunas realizaciones, la etapa de lisado y desemulsión de una etapa comprende añadir una base para elevar el pH de las células y la composición de células lisadas. En algunas realizaciones, la etapa de lisado y desemulsión de una etapa comprende añadir una base para elevar el pH de las células y la composición de células lisadas a aproximadamente 8 o superior.

En algunas realizaciones, las células se lisan a un pH adecuado para formar una composición desemulsionada de células lisadas. En algunas realizaciones, se obtiene un pH adecuado añadiendo un ácido como ya se describió anteriormente en este documento. Un pH adecuado se selecciona de 0,5 a 6. En otras realizaciones, un pH adecuado se selecciona desde aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 5,5; aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 5; aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 4,5; aproximadamente 0,5 a aproximadamente 4; aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 3,5; aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 3; aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 2,5; aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 2; aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 1,5; aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 1; aproximadamente 1 hasta aproximadamente 6; aproximadamente 1 hasta aproximadamente 5,5; aproximadamente 1 hasta aproximadamente 5; aproximadamente 1 hasta aproximadamente 4,5; aproximadamente 1 hasta aproximadamente 4; aproximadamente 1 hasta aproximadamente 3,5; aproximadamente 1 hasta aproximadamente 3; aproximadamente 1 hasta aproximadamente 2,5; aproximadamente 1 hasta aproximadamente 2; aproximadamente 1 hasta aproximadamente 1,5; aproximadamente 1,5 hasta aproximadamente 6; aproximadamente 1,5 hasta aproximadamente 5,5; aproximadamente 1,5 hasta aproximadamente 5; aproximadamente 1,5 hasta aproximadamente 4,5; aproximadamente 1,5 hasta aproximadamente 4; aproximadamente 1,5 hasta aproximadamente 3,5; aproximadamente 1,5 hasta aproximadamente 3; aproximadamente 1,5 hasta aproximadamente 2,5; aproximadamente 1,5 hasta aproximadamente 2; aproximadamente 2 hasta aproximadamente 6; aproximadamente 2 hasta aproximadamente 5,5; aproximadamente 2 hasta aproximadamente 5; aproximadamente 2 hasta aproximadamente 4,5; aproximadamente 2 hasta aproximadamente 4, aproximadamente 2 hasta aproximadamente 3,5; aproximadamente 2 hasta aproximadamente 3; aproximadamente 2 hasta aproximadamente 2,5; aproximadamente 2,5 hasta aproximadamente 6; aproximadamente 2,5 hasta aproximadamente 5,5; aproximadamente 2,5 hasta aproximadamente 5; aproximadamente 2,5 hasta aproximadamente 4,5; aproximadamente 2,5 hasta aproximadamente 4; aproximadamente 2,5 hasta aproximadamente 3,5; aproximadamente 2,5 hasta aproximadamente 3; aproximadamente 3 hasta aproximadamente 6; aproximadamente 3 hasta aproximadamente 5,5; aproximadamente 3 hasta aproximadamente 5; aproximadamente 3 hasta aproximadamente 4,5; aproximadamente 3 hasta aproximadamente 4; aproximadamente 3 hasta aproximadamente 3,5; aproximadamente 3,5 hasta aproximadamente 6; aproximadamente 3,5 hasta aproximadamente 5,5; aproximadamente 3,5 hasta aproximadamente 5; aproximadamente 3,5 hasta aproximadamente 4,5; aproximadamente 3,5 hasta aproximadamente 4; aproximadamente 4 hasta aproximadamente 6; aproximadamente 4 hasta aproximadamente 5,5; aproximadamente 4 hasta aproximadamente 5; aproximadamente 4 hasta aproximadamente 4,5; aproximadamente 4,5 hasta aproximadamente 7; aproximadamente 4,5 hasta aproximadamente 6,5; aproximadamente 4,5 hasta aproximadamente 6; aproximadamente 4,5 hasta aproximadamente 5,5; aproximadamente 4,5 hasta aproximadamente 5; aproximadamente 5 hasta aproximadamente 6; aproximadamente 5 hasta aproximadamente 5,5; y aproximadamente 5,5 hasta aproximadamente 6.

En algunas realizaciones, el proceso comprende desemulsionar las células lisadas no lavadas que comprenden aceite microbiano para formar una composición desemulsionada de células lisadas no lavadas; y entonces separar el aceite de la composición desemulsionada de células lisadas no lavadas. Una composición desemulsionada de células lisadas no lavadas se refiere al proceso por el cual no se lava la composición de células lisadas, por ejemplo, con agua o tampón que luego se retira, por ejemplo, por centrifugación. El lavado de una composición de células lisadas puede disminuir el rendimiento global de aceite obtenido a partir de una célula.

En una realización alternativa, el número de veces que se lava la composición de células lisadas se pueden disminuir en 1 vez, 2 veces, 3 veces o más. En algunas realizaciones, el lavado es no superior a 1 vez, 2 veces o 3 veces.

En algunas realizaciones, las diversas combinaciones de formación de una composición de células lisadas, adición de un emulsionante a la composición de células lisadas, puesta en contacto de una composición de células lisadas con

un ácido o disminución del pH de una composición de células lisadas, puesta en contacto de una composición de células lisadas con una sal, calentamiento de la composición de células lisadas y agitación de una composición de células lisadas puede ocurrir en un único recipiente. En algunas realizaciones, las diversas combinaciones de formación de células, puesta en contacto de células con un ácido o disminución del pH de células, adición de un emulsionante a la composición de células lisadas, puesta en contacto de células con una sal, calentamiento de las células y agitación de las células puede ocurrir en un único recipiente. En algunas realizaciones, el único recipiente incluye un recipiente de fermentación. En algunas realizaciones, el recipiente de fermentación puede tener un volumen de al menos 20.000 litros, al menos 50.000 litros, al menos 100.000 litros, al menos 120.000 litros, al menos 150.000 litros, al menos 200.000 litros o al menos 220.000 litros. En algunas realizaciones, el recipiente de fermentación puede tener un volumen de 20.000 litros a 220.000 litros, 20.000 litros a 100.000 litros, 20.000 litros a 50.000 litros, 50.000 litros a 220.000 litros, 50.000 litros a 150.000 litros, 50.000 litros a 100.000 litros, 100.000 litros a 220.000 litros, 100.000 litros a 150.000 litros, 100.000 litros a 120.000 litros, 150.000 litros a 220.000 litros, 150.000 litros a 200.000 litros, o 200.000 litros a 220.000 litros.

En algunas realizaciones, una cantidad de células y/o composición de células lisadas formada en un recipiente se puede transferir a uno o más recipientes de agitación. En algunas realizaciones, los recipientes de agitación pueden tener un volumen de al menos 20.000 litros, al menos 30.000 litros, al menos 40.000 litros o al menos 50.000 litros. En algunas realizaciones, los recipientes de agitación pueden tener un volumen de 20.000 litros a 50.000 litros, 20.000 litros a 40.000 litros, 20.000 litros a 30.000 litros, 30.000 litros a 50.000 litros, 30.000 litros a 40.000 litros o 40.000 litros a 50.000 litros.

En general, los procesos descritos en el presente documento no utilizan un disolvente orgánico para obtener, separar o recuperar de otro modo un aceite microbiano de las células microbianas. En algunas realizaciones, no se usa disolvente orgánico en la obtención de aceite microbiano de las células microbianas. En otra realización, no se añade un disolvente orgánico a las células, no se añade a una composición de células lisadas y/o no se añade a un aceite durante los procesos desvelados en el presente documento en una cantidad o concentración suficiente para obtener un aceite microbiano. Los disolventes orgánicos incluyen disolventes polares, disolventes no polares, disolventes miscibles en agua, disolventes inmiscibles en agua y combinaciones de los mismos.

El proceso según la invención comprende separar el aceite de la composición desemulsionada de células lisadas. En algunas realizaciones, el proceso comprende separar un aceite de la composición desemulsionada de células lisadas por centrifugación de la composición desemulsionada de células lisadas. En algunas realizaciones, un aceite se separa de una composición desemulsionada de células lisadas dejando que la composición desemulsionada de células lisadas reposa, en donde el aceite se separa (por ejemplo, como una capa separada) de la composición desemulsionada de células lisadas usando la gravedad. En algunas realizaciones, la separación se logra por una membrana lipófila. En algunas realizaciones, la separación comprende centrifugar a una temperatura de 10 ºC a 100 ºC. En algunas realizaciones, el aceite se separa de la composición desemulsionada de células lisadas elevando primero el pH (por ejemplo, añadiendo una base que se describe anteriormente en este documento) y luego centrifugando la composición desemulsionada de células lisadas para obtener el aceite.

En algunas realizaciones, el pH de la composición desemulsionada de células lisadas se eleva añadiendo una base a la composición desemulsionada de células lisadas. Las bases que se pueden añadir a la composición desemulsionada de células lisadas son las mismas que las expuestas anteriormente en este documento. En algunas realizaciones, el pH se selecciona desde aproximadamente 7,5 o superior; aproximadamente 8 o superior; aproximadamente 9 o superior; aproximadamente 10 o superior; aproximadamente 11 o superior; y aproximadamente 12 o superior. En otras realizaciones, el pH se selecciona de un pH de 7 a 13; 7 a 12; 7 a 11; 7 a 10; 7 a 9; 8 a 13; 8 a 12; 8 a 11; 8 a 10; 8 a 9; 9 a 12; 9 a 11; 9 a 10; 10 a 12; y 10 a 11.

En algunas realizaciones, el proceso comprende separar un aceite de la composición desemulsionada de células lisadas por centrifugación de la composición desemulsionada de células lisadas a una temperatura de al menos 10 ºC, al menos 20 ºC, al menos 25 ºC, al menos 30 ºC, al menos 35 ºC, al menos 40 ºC, al menos 45 ºC, al menos 50 ºC, al menos 55 ºC, al menos 60 ºC, al menos 65 ºC, al menos 70 ºC, al menos 75 ºC, al menos 80 ºC, al menos 85 ºC, al menos 90 ºC, al menos 95 ºC o al menos 100 ºC. En algunas realizaciones, el proceso comprende separar un aceite de la composición desemulsionada de células lisadas por centrifugación de la composición desemulsionada de células lisadas a una temperatura de 10 ºC a 100 ºC, 10 ºC a 90 ºC, 10 ºC a 80 ºC, 20 ºC a 100 ºC, 20 ºC a 90 ºC, 20 ºC a 80 ºC, 25 ºC a 100 ºC, 25 ºC a 90 ºC, 25 ºC a 80 ºC, 25 ºC a 75 ºC, 30 ºC a 100 ºC, 30 ºC a 90 ºC, 30 ºC a 80 ºC, 40 ºC a 100 ºC, 40 ºC a 90 ºC, 40 ºC a 80 ºC, 50 ºC a 100 ºC, 50 ºC a 90 ºC, 50 ºC a 80 ºC, 50 ºC a 70 ºC, 60 ºC a 100 ºC, 60 ºC a 90 ºC, 60 ºC a 80 ºC, 60 ºC a 70 ºC, 70 ºC a 100 ºC, 70 ºC a 90 ºC, 70 ºC a 80 ºC, 80 ºC a 100 ºC, 80 ºC a 90 ºC, o 90 ºC a 100 ºC.

En algunas realizaciones, la centrifugación se realiza a una tasa de alimentación (de una composición desemulsionada de células lisadas en una centrifugadora) de 1 kilogramo por minuto (kg/min) a 500 kg/min, 1 kg/min a 400 kg/min, 1 kg/min a 300 kg/min, 1 kg/min a 200 kg/min, 1 kg/min a 100 kg/min, 1 kg/min a 75 kg/min, 1 kg/min a 50 kg/min, 1 kg/min a 40 kg/min, 1 kg/min a 30 kg/min, 1 kg/min a 25 kg/min, 1 kg/min a 10 kg/min, 10 kg/min a 500 kg/min, 10 kg/min a 400 kg/min, 10 kg/min a 300 kg/min, 10 kg/min a 200 kg/min, 10 kg/min a 100 kg/min, 10 kg/min a 75 kg/min, 10 kg/min a 50 kg/min, 10 kg/min a 40 kg/min, 10 kg/min a 30 kg/min, 20 kg/min a 500 kg/min, 20 kg/min a 400 kg/min, 20 kg/min a 300 kg/min, 20 kg/min a 200 kg/min, 20 kg/min a 100 kg/min, 20 kg/min a 75 kg/min, 20 kg/min

a 50 kg/min, 20 kg/min a 40 kg/min, 25 kg/min a 500 kg/min, 25 kg/min a 400 kg/min, 25 kg/min a 300 kg/min, 25 kg/min a 200 kg/min, 25 kg/min a 100 kg/min, 25 kg/min a 75 kg/min, 25 kg/min a 50 kg/min, 30 kg/min a 60 kg/min, 30 kg/min a 50 kg/min, 30 kg/min a 40 kg/min, 50 kg/min a 500 kg/min, 100 kg/min a 500 kg/min o 200 kg/min a 500 kg/min.

En algunas realizaciones, el proceso comprende centrifugar una composición desemulsionada de células lisadas a una fuerza centrífuga de 1.000 g a 25.000 g, 1.000 g a 20.000 g, 1.000 g a 10.000 g, 2.000 g a 25.000 g, 2.000 g a 20.000 g, 2.000 g a 15.000 g, 3.000 g a 25.000 g, 3.000 g a 20.000 g, 5.000 g a 25.000 g, 5.000 g a 20.000 g, 5.000 g a 15.000 g, 5.000 g a 10.000 g, 5.000 g a 8.000 g, 10.000 g a 25.000 g, 15.000 g a 25.000 g, o al menos 1.000 g, al menos 2.000 g, al menos 4.000 g, al menos 5.000 g, al menos 7.000 g, al menos 8.000 g, al menos 10.000 g, al menos 15.000 g, al menos 20.000 g o al menos 25.000 g. Como se usa en el presente documento, "g" se refiere a la gravedad estándar o aproximadamente 9,8 m/s^2. En algunas realizaciones, el proceso comprende centrifugar una composición desemulsionada de células lisadas a 4.000 rpm a 14.000 rpm, 4.000 rpm a 10.000 rpm, 6.000 rpm a 14.000 rpm, 6.000 rpm a 12.000 rpm, 8.000 a 14.000 rpm, 8.000 rpm a 12.000 rpm, o 8.000 rpm a 10.000 rpm.

En algunas realizaciones, el aceite se puede recuperar, por ejemplo, por decantación, desnatado, aspiración, bombeo, succión, extracción, extracción con sifón o recuperación de otro modo del aceite microbiano de la superficie de la composición separada.

En algunas realizaciones, el proceso comprende secar el aceite que se ha recuperado para retirar el agua del aceite. En algunas realizaciones, el secado del aceite puede incluir, pero no se limita a, calentar el aceite para evaporar el agua. En algunas realizaciones, después del secado, el aceite tiene un contenido de agua en porcentaje en peso (o volumen) de aceite que es inferior a 3 %, inferior a 2,5 %, inferior a 2 %, inferior a 1,5 %, inferior a 1 %, inferior a 0,5 %, inferior a 0,1 %, o 0 %. En algunas realizaciones, después del secado, el aceite tiene un contenido de agua en porcentaje en peso (o volumen) de aceite de 0 % a 3 %, 0 % a 2,5 %, 0 % a 2 %, 0 % a 1,5 %, 0 % a 1 %, 0 % a 0,5 %, 0,1 % a 3 %, 0,1 % a 2,5 %, 0,1 % a 2 %, 0,1 % a 1,5 %, 0,1 % a 1 %, 0,1 % a 0,5 %, 0,5 % a 3 %, 0,5 % a 2,5 %, 0,5 % a 2 %, 0,5 % a 1,5 %, 0,5 % a 1 %, 1 % a 3 %, 1 % a 2,5 %, 1 % a 2 %, 1 % a 1,5 %, 1,5 % a 3 %, 1,5 % a 2,5 %, 1,5 % a 2 %, 2 % a 3 %, 2 % a 2,5 %, o 2,5 % a 3 %.

En el presente documento se desvela un aceite microbiano que se puede obtener de células microbianas por cualquiera de los procesos desvelados en el presente documento. En algunas realizaciones, el aceite comprende al menos 30 % en peso (o volumen) de ácido araquidónico. En algunas realizaciones, el aceite comprende al menos 30 % en peso (o volumen) de ácido docosahexaenoico.

El valor de anisidina (AV) se determina según el método oficial de la AOCS Cd 18-90. En una realización, el aceite descrito en el presente documento tiene un AV inferior a aproximadamente 50; inferior a aproximadamente 40; inferior a aproximadamente 30; inferior a aproximadamente 20; inferior a aproximadamente 15; o inferior a aproximadamente 10. En algunas realizaciones, el aceite tiene un AV inferior a aproximadamente 50. El término valor de anisidina se refiere a la medida de los productos secundarios de reacción, tales como aldehídos y cetonas que ocurren durante la oxidación del aceite.

El valor de peróxido (PV) se determina según el método oficial de la AOCS Cd 8-53. En una realización, el aceite descrito en el presente documento tiene un PV inferior a aproximadamente 20 meq/kg; inferior a aproximadamente 10 meq/kg; o inferior a aproximadamente 5 meq/kg. En algunas realizaciones, el aceite tiene un PV inferior a aproximadamente 5 meq/kg. El término valor de peróxido se refiere a la medida de los productos primarios de reacción, tales como peróxidos e hidroperóxidos, que ocurren durante la oxidación del aceite. Como se usa en el presente documento, el valor de peróxido se mide en meq/kg.

En algunas realizaciones, el aceite tiene un contenido de fósforo de 100 ppm o menos, 95 ppm o menos, 90 ppm o menos, 85 ppm o menos, 80 ppm o menos, 75 ppm o menos, 70 ppm o menos, 65 ppm o menos, 60 ppm o menos, 55 ppm o menos, 50 ppm o menos, 45 ppm o menos, 40 ppm o menos, 35 ppm o menos, 30 ppm o menos, 25 ppm o menos, 20 ppm o menos, 15 ppm o menos, 10 ppm o menos, 9 ppm o menos, 8 ppm o menos, 7 ppm o menos, 6 ppm o menos, 5 ppm o menos, 4 ppm o menos, 3 ppm o menos, 2 ppm o menos, o 1 ppm o menos. En algunas realizaciones, el aceite tiene un contenido de fósforo de aproximadamente 8 ppm o menos.

El aceite comprende uno o más PUFAs. En algunas realizaciones, el aceite al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, o al menos 80 % de ARA (por peso de ARA). En algunas realizaciones, un aceite comprende al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 50 % a 95 %, 50 % a 90 %, 50 % a 85 %, 50 % a 80 %, 50 % a 75 %, 60 % a 95 %, 60 % a 90 %, 60 % a 85 %, 70 % a 95 %, 70 % a 90 %, 70 % a 85 %, 75 % a 95 %, 75 % a 90 %, o 75 % a 85 %, en peso (o volumen) de triglicéridos.

En algunas realizaciones, los triglicéridos comprenden al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 % o al menos 80 % en peso (o volumen) de ARA.

En una realización, el aceite microbiano obtenido y/o recuperado por cualquiera de los procesos descritos en el presente documento es un aceite en bruto. En otra realización, el aceite descrito en el presente documento es un aceite refinado. Un "aceite en bruto" es un aceite obtenido de células microbianas sin procesamiento adicional. Un "aceite refinado" es un aceite obtenido tratando un aceite en bruto con procesamiento estándar de refinado, blanqueamiento y/o desodorización. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. Nº 5.130.242. En algunas realizaciones, el refinado incluye, pero no se limita a, refinado cáustico, desgomado, tratamiento ácido, tratamiento alcalino, enfriamiento, calentamiento, blanqueamiento, desodorización, desacidificación y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, el proceso comprende concentrar un caldo de fermentación que comprende células microbianas. En algunas realizaciones, el proceso comprende concentrar la composición de células lisadas. Como se usa en el presente documento, "concentrar" se refiere a retirar el agua de una composición. La concentración puede incluir, pero no se limita a, evaporación, secado químico, centrifugación y similares, y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, una composición de células o una composición de células lisadas se concentra para proporcionar una concentración de aceite de al menos 4 %, al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, o al menos 30 % en peso (o volumen) de la composición de células lisadas. En algunas realizaciones, una composición de células o una composición de células lisadas se concentra para proporcionar una concentración de aceite de 4 % a 40 %, 4 % a 30 %, 4 % a 20 %, 4 % a 15 %, 5 % a 40 %, 5 % a 30 %, 5 % a 20 %, 10 % a 40 %, 10 % a 30 %, 10 % a 20 %, 15 % a 40 %, 15 % a 30 %, 20 % a 40 %, 20 % a 30 %, 25 % a 40 %, o 30 % a 40 % en peso (o volumen) de la composición de células lisadas.

Las condiciones de cultivo eficaces para una célula microbiana para su uso con la invención incluyen, pero no se limitan a, condiciones de medios eficaces, biorreactores, temperatura, pH y oxígeno que permiten la producción de aceite. Un medio eficaz se refiere a cualquier medio en el que normalmente se cultiva una célula microbiana. Dicho medio comprende normalmente un medio acuoso que tiene fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y fosfato, además de sales, minerales, metales apropiados, y otros nutrientes, tales como vitaminas. Las células microbianas para su uso con la presente invención se pueden cultivar en biorreactores de fermentación convencionales, matraces con agitación, tubos de ensayo, placas de microtitulación y placas de Petri.

En algunas realizaciones, una célula microbiana comprende al menos 30 % en peso (o volumen) de aceite, al menos 35 % en peso (o volumen) de aceite, al menos 40 % en peso (o volumen) de aceite, al menos 50 % en peso (o volumen) de aceite, al menos 60 % en peso (o volumen) de aceite, al menos 70 % en peso (o volumen) de aceite o al menos 80 % en peso (o volumen) de aceite. En algunas realizaciones, una célula microbiana para su uso con la presente invención es capaz de producir al menos 0,01 gramos por litro por hora (g/L/h) de ARA, al menos 0,05 g/L/h de ARA, al menos 0,1 g/L/h de ARA, al menos 0,2 g/L/h de ARA, al menos 0,3 g/L/h de ARA o al menos 0,4 g/L/h de ARA.

En algunas realizaciones, un aceite obtenido según cualquiera de los procesos descritos en el presente documento, la biomasa agotada, o combinaciones de los mismos, se puede usar directamente como un alimento o ingrediente de alimento, tal como un componente en comida de bebé, leche de inicio, bebidas, salsas, alimentos basados en lácteos (tales como leche, yogurt, queso y helado), aceites (por ejemplo, aceites para cocinar o aliños para ensalada) y productos de panadería y confitería; suplementos nutricionales (por ejemplo, en formas en cápsulas o comprimidos); pienso o suplemento para piensos para cualquier animal no humano (por ejemplo, aquellos cuyos productos (por ejemplo, carne, leche o huevos) son consumidos por seres humanos); suplementos alimenticios; y productos farmacéuticos (en aplicación de terapia directa o complementaria). El término "animal" se refiere a cualquier organismo que pertenece al reino *Animalia* e incluye cualquier animal humano, y animal no humano del que se obtienen productos (por ejemplo, leche, huevos, carne de aves de corral, ternera, cerdo o cordero). En algunas realizaciones, el aceite y/o la biomasa se pueden usar en pescado. El pescado se obtiene de, sin limitación, pescado, gambas y crustáceos. El término "productos" incluye cualquier producto derivado de dichos animales, que incluyen, sin limitación, carne, huevos, leche u otros productos. Cuando el aceite y/o la biomasa se alimentan a dichos animales, se pueden incorporar aceites poliinsaturados en la carne, leche, huevos u otros productos de dichos animales para aumentar su contenido en estos aceites.

Ejemplos

Ejemplo 1

Se dispuso un caldo de células (2500-3000 litros) que contenía células microbianas *(Mortierella)* en un tanque de decantación durante varias horas para sedimentar. Una vez sedimentadas, se bombeó 50-60 % del líquido sin biomasa para ser desechado. Entonces se pasó el caldo de células pasteurizadas no lavadas concentrado a través de una mezcladora de alto cizallamiento (Siemens ULTRA-Turrax UTL 1000/10 a 60 Hz) que estaba en línea con el tanque de tratamiento. Se formó una composición desemulsionada de células lisadas añadiendo 3 %, en peso de caldo, de una disolución al 98 % en peso de H_2SO_4 para ajustar el pH a 0,9 a 1,5 y el caldo se calentó hasta 94 ºC durante 20-24 horas o hasta que 1 mL en una dilución de 10 mL de caldo en agua desionizada dio un tamaño de partículas de 25 µm o menos. Se diluyó la composición desemulsionada de células lisadas con agua desoxigenada hasta un contenido de sólidos de 10 % (número generado usando el analizador de humedad Omnimark Uwave) y se recalentó hasta 85 ºC si la adición de agua causó que la temperatura bajara por debajo de 85 ºC. Se separó el aceite microbiano de la composición desemulsionada de células lisadas añadiendo una disolución al 50 % de NaOH para ajustar el pH a 7,8-

8,2, dejando que la composición se mezclara durante 30 minutos o hasta que la centrifugación de una muestra mostró la ausencia de completa de una fase de emulsión, y centrifugando (Seital SR1010) la composición en línea a 1750 rpm y a un caudal de 7 litros/min durante 7-10 horas para recuperar el aceite en bruto.

Cada uno de los tres lotes separados de caldo de células se sometió independientemente al proceso anterior.

El lote 1 aceite en bruto dio 86,6 % de ARA (por peso de ARA) y un aceite en bruto filtrado secado con un AV de 26,1 y un PV de 0,39 meq.

El lote 2 aceite en bruto dio 87,6 % de ARA (por peso de ARA) y un aceite en bruto filtrado secado con un AV de 14 y un PV de 0,31 meq.

El lote 3 aceite en bruto dio 85 % de ARA (por peso de ARA) y un aceite en bruto filtrado secado con un AV de 24,7 y un PV de 0,51 meq.

Ejemplo 2

Se pasteurizó un caldo de células (1000 mL) que contenía células microbianas (*Mortierella*) a 70 ºC durante 1 hora. Se formó una composición desemulsionada de células lisadas añadiendo 4 %, en peso de caldo, de ácido nítrico (disolución al 70 %) para ajustar el pH a 0,7-1,0 y calentando el caldo hasta 90 ºC mientras se agitaba a una velocidad de 200 rpm durante 30 horas. Se separó el aceite microbiano de la composición desemulsionada de células lisadas añadiendo disolución al 50 % p/p de NaOH para ajustar el pH 8,0-8,2 y centrifugando (Thermo Sorvall ST 40R) la composición a 8.000 g durante 5 minutos para proporcionar un aceite en bruto, que dio 74,13 % de ARA (en peso de ARA) y un aceite en bruto con un AV de 27,9.

Ejemplo 3

Se pasteurizó un caldo de células (1000 mL) que contenía células microbianas (*Mortierella)* a 70 ºC durante 1 hora. Se formó una composición desemulsionada de células lisadas añadiendo 15 %, en peso de caldo, de ácido fosfórico (disolución al 85 %) para ajustar el pH a 0,7 a 1,5 y calentando la composición hasta 90 ºC mientras se agitaba a una velocidad de 200 rpm durante 50 horas. Se separó el aceite microbiano de la composición desemulsionada de células lisadas añadiendo disolución al 50 % p/p de NaOH para ajustar el pH 8,0-8,2 y centrifugando (Thermo Sorvall ST 40R) la composición a 8.000 g durante 5 minutos para proporcionar un aceite en bruto, que dio 42,61 % de ARA (en peso de ARA). El aceite en bruto tuvo un AV de 16,1.

Ejemplo 4

Se pasteurizó un caldo de células (1000 mL) que contenía células microbianas (*Mortierella*) a 70 ºC durante 1 hora. Se formó una composición desemulsionada de células lisadas añadiendo 6 %, en peso de caldo, de ácido clorhídrico (disolución al 32 %) para ajustar el pH a 0,7-1,5 y calentando el caldo hasta 90 ºC mientras se agitaba a una velocidad de 200 rpm durante 50 horas. Se separó el aceite microbiano de la composición desemulsionada de células lisadas añadiendo disolución al 50 % p/p de NaOH para ajustar el pH de la composición a 8,0-8,2 y centrifugando (Thermo Sorvall ST 40R) la composición a 8.000 g durante 5 minutos para proporcionar un aceite en bruto, que dio 72,61 % de ARA (en peso de ARA). El aceite en bruto tuvo un AV de 11,1.

Ejemplo 5

Se pasteurizó un caldo de células no lavadas (2129,8 kg) que contenía células microbianas (*Mortierella*) a 70 ºC durante 1 hora y luego se pasó a través de una mezcladora de alto cizallamiento (Siemens ULTRA-Turrax UTL 1000/10 a 60 Hz) que estaba en línea con el tanque de tratamiento. Se formó una composición desemulsionada de células lisadas: añadiendo 3,5 %, en peso de caldo, de una disolución al 98 % de ácido sulfúrico para ajustar el pH a ,07 a 1,5; calentando hasta 90 ºC; y manteniendo durante 28 horas mientras se agitaba a una velocidad de 200 rpm. Se separó el aceite microbiano de la composición desemulsionada de células lisadas neutralizando la composición y ajustando el pH a 8,0 mediante la adición de 50 % de NaOH y 2 %, en peso de la composición, de NaCl, y luego centrifugando (Seital SR1010) la composición para proporcionar un aceite en bruto, que dio 77,4 % de ARA (en peso de ARA) y un aceite en bruto con un AV de 12,4, un contenido de FFA de 2,27 % y un PV de 0,13 meq.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso de obtención de un aceite microbiano que comprende uno o más ácidos grasos poliinsaturados de una o más células microbianas de *Mortierella alpina*, en donde el proceso comprende:

(a) lisar las células que comprenden el aceite microbiano para formar una composición de células lisadas;

(b) desemulsionar la composición de células lisadas para formar una composición desemulsionada de células lisadas;

(c) separar el aceite de la composición desemulsionada de células lisadas; y

(d) recuperar el aceite;

en donde (b) comprende reducir el pH de la composición de células lisadas a desde 0,5 hasta 6.

2. El proceso de la reivindicación 1, en donde el pH se reduce añadiendo un ácido seleccionado de ácido sulfúrico, fosfórico, clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, hipocloroso, cloroso, clórico, perclórico, fluorosulfúrico nítrico, fluoroantimónico, fluorobórico, hexafluorofosfórico, crómico, bórico, acético, cítrico, fórmico y combinaciones de los mismos.

3. El proceso de la reivindicación 2, en donde el ácido es ácido sulfúrico.

4. El proceso de cualquier reivindicación precedente, en donde (b) comprende además añadir un ácido en una cantidad de desde 0,5 % hasta 20 %, en peso, de la composición de células lisadas.

5. El proceso de cualquier reivindicación precedente, en donde al menos uno de (a) o (b) comprende además calentar las células o la composición hasta al menos 70 ºC, preferentemente hasta desde 70 ºC hasta 100 ºC.

6. El proceso de cualquier reivindicación precedente, en donde (b) comprende además añadir un emulsionante a la composición de células lisadas, preferentemente en donde el emulsionante es un emulsionante iónico, más preferentemente en donde el emulsionante iónico es un emulsionante aniónico seleccionado de un emulsionante aniónico de sulfato, un emulsionante aniónico de sulfonato, un emulsionante aniónico de fosfato, un emulsionante aniónico de carboxilato y combinaciones de los mismos, más preferentemente en donde el emulsionante iónico es un emulsionante aniónico de sulfato seleccionado de laurilsulfato de amonio, dodecilsulfato de sodio, laureth sulfato de sodio, lauril éter sulfato de sodio, miristil éter sulfato de sodio y combinaciones de los mismos.

7. El proceso de la reivindicación 6, en donde el emulsionante se añade en una cantidad de desde 0,2 % hasta 10 % en peso de la composición de células lisadas.

8. El proceso de cualquier reivindicación precedente, en donde (b) comprende además añadir una sal en una cantidad de desde 0,05 % hasta 20 %, en peso, de la composición de células lisadas, preferentemente en donde la sal se selecciona del grupo que consiste en sales de metales alcalinos, sales de metales alcalinotérreos, sales de sulfato y combinaciones de las mismas.

9. El proceso de cualquier reivindicación precedente, en donde

(i) (b) comprende además agitar la composición de células lisadas;

(ii) (a) comprende además agitar las células;

(iii) las células de (a) están no lavadas;

(iv) las células de (a) están contenidas en un caldo de fermentación;

(v) (c) comprende además centrifugar la composición desemulsionada de células lisadas;

(vi) la composición de células lisadas comprende líquido, residuo celular y aceite microbiano;

(vii) no se usa un disolvente orgánico para obtener el aceite de las células; y/o

(viii) (c) comprende además elevar el pH de la composición desemulsionada de células lisadas.

10. El proceso de cualquier reivindicación precedente, en donde el ácido graso poliinsaturado es ácido araquidónico (ARA).

11. El proceso de cualquier reivindicación precedente, en donde el aceite de (d) es un aceite en bruto, preferentemente en donde (d) comprende además refinar el aceite en bruto para obtener un aceite refinado.

12. El proceso de cualquier reivindicación precedente, en donde el aceite comprende al menos 30 % en peso de ácido araquidónico.

13. El proceso según cualquier reivindicación precedente, en donde (a) y (b) se combinan juntas para formar una etapa de lisado y desemulsionado de una etapa.

14. El proceso según cualquier reivindicación precedente, en donde (c) comprende además elevar el pH de la composición desemulsionada de células lisadas.