

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 735 987**

51 Int. Cl.:

C12P 7/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.01.2001 E 10176025 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019 EP 2295595**

54 Título: **Procedimiento de extracción sin disolvente**

30 Prioridad:

19.01.2000 US 177125 P

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

23.12.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 735 987 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de extracción sin disolvente

Campo de la invención

5 La presente invención se dirige a un procedimiento para extraer lípidos que contienen un ácido graso altamente insaturado omega-3 procedente de microorganismos sin el uso de una cantidad significativa de un disolvente orgánico apolar.

Antecedentes de la invención

10 Un procedimiento típico de fabricación de lípidos de microorganismos, tal como la producción de ácido graso altamente insaturado omega-3, en particular, una mezcla de lípidos rica en ácido docosahexaenoico (DHA), implica hacer crecer microorganismos que son capaces de producir el lípido deseado en un fermentador, estanque o biorreactor, aislar la biomasa microbiana, secarla y extraer lípidos intracelulares con un disolvente orgánico apolar, p. ej., hexano. Generalmente, los lípidos intracelulares de microorganismos se extraen después de romper (es decir, lisar) células secadas de los microorganismos. Los lípidos extraídos se pueden refinar adicionalmente para producir lípidos de alta pureza y/o calidad. Generalmente, los microorganismos se aíslan al diluir el caldo de fermentación con agua y centrifugar la mezcla para aislar microorganismos. A continuación, las células se secan y, si los lípidos no se extraen inmediatamente o poco después, las células se envasan, por ejemplo, en bolsas cerradas herméticamente al vacío, para evitar la degradación de lípidos.

20 Desgraciadamente, el procedimiento de secado expone a los microorganismos a calor, lo que puede dañar, es decir, degradar la calidad de, los lípidos si se realiza incorrectamente. Las bolsas cerradas herméticamente al vacío pueden desarrollar fugas, lo que puede degradar adicionalmente la calidad de los lípidos debido a la exposición de los microorganismos a aire. Además, si los microorganismos secados no se tratan con un antioxidante, los lípidos se pueden degradar adicionalmente debido a la exposición a aire y/o luz. Por ejemplo, los carotenoides, las xantofilas y ácidos grasos de cadena larga tales como DHA se pueden degradar debido a la oxidación por aire y/o luz. Por otra parte, en algunos casos, los operarios que están expuestos a los microorganismos secados pueden desarrollar una reacción alérgica creando un riesgo de seguridad y/o salud para los operarios.

30 Por otra parte, en una producción a escala industrial, la gran cantidad de disolvente orgánico apolar volátil e inflamable usada en la extracción de lípidos puede crear condiciones de trabajo peligrosas. El uso de disolvente orgánico apolar en el procedimiento de extracción puede necesitar usar un sistema de recuperación de aceite a prueba de explosiones, que se suma de ese modo al coste de la recuperación de lípidos. Por otra parte, el uso de un disolvente orgánico apolar para extraer lípidos de microorganismos genera una corriente residual de disolvente orgánico apolar que requiere un método de eliminación apropiado, que incrementa adicionalmente el coste de producción global de la extracción de lípidos.

35 Por otra parte, existe una necesidad de un procedimiento para extraer lípidos de microorganismos que no requiera el uso de un disolvente orgánico apolar. También existe una necesidad de un procedimiento de extracción de lípidos a partir de microorganismos que no requiera la etapa costosa de secar los microorganismos antes de la extracción.

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

Sumario de la invención

45 La presente invención proporciona un procedimiento para obtener lípido que contiene un ácido graso altamente insaturado omega-3 de microorganismos, que comprende:

(a) lisar células de los microorganismos para producir una mezcla celular lisada;

50 (b) centrifugar dicha mezcla celular lisada para producir una mezcla separada en fases que comprende una capa pesada y una capa ligera, en donde dicha capa pesada comprende una solución acuosa y dicha capa ligera comprende dicho lípido;

(c) separar dicha capa pesada de dicha capa ligera; y

(d) obtener dicho lípido de dicha capa ligera,

en donde el procedimiento se realiza sin usar un disolvente orgánico apolar.

Se divulga además un procedimiento para obtener lípidos para microorganismos que comprende:

- 5 (a) hacer crecer microorganismos en un medio de cultivo;
- (b) tratar dicho medio de cultivo y las células de microorganismo para liberar lípidos intercelulares;
- (c) someter al medio de cultivo que contiene los lípidos intracelulares liberados a separación por gravedad para formar una fase ligera que contiene lípidos y una fase pesada;
- (d) separar dicha fase ligera de dicha fase pesada;
- 10 (e) tratar dicha fase ligera para romper una emulsión formada entre dicho lípido y agua; y
- (f) recuperar un lípido en bruto.

Además, se divulga un procedimiento para recuperar lípidos de microorganismos que comprende las etapas:

- (a) hacer crecer dichos microorganismos en un medio de cultivo;
- 15 (b) tratar las células de microorganismo procedentes de dicho medio de cultivo sin secar dichas células para liberar lípidos intercelulares;
- (c) someter al medio de cultivo que contiene los lípidos intracelulares liberados a separación por gravedad para formar una fase ligera que contiene lípidos y una fase pesada;
- (d) separar dicha fase ligera de dicha fase pesada;
- (e) tratar dicha fase ligera para romper una emulsión formada entre dicho lípido y agua; y
- 20 (f) recuperar un lípido en bruto.

Preferiblemente, los microorganismos se cultivan en un medio de fermentación en un fermentador. Alternativamente, los microorganismos se pueden cultivar fotosintéticamente en un fotobiorreactor o un estanque. Preferiblemente, los microorganismos son microorganismos ricos en lípidos, más preferiblemente, los microorganismos se seleccionan del grupo que consiste en algas, bacterias, hongos y protistas, más preferiblemente, los microorganismos se seleccionan del grupo que consiste en algas doradas, algas verdes, dinoflagelados, levaduras, hongos del género *Mortierella*, y Stramenopiles. Preferiblemente, los microorganismos comprenden microorganismos del género *Mortierella*, el género *Cryptocodium*, y otros Thraustochytriales, y más preferiblemente, los microorganismos se seleccionan del género *Thraustochytrium*, *Schizochytrium* o sus mezclas, más preferiblemente, los microorganismos se seleccionan del grupo que consiste en microorganismos que tienen las características identificativas del número ATCC 20888, el número ATCC 20889, el número ATCC 20890, el número ATCC 20891 y el número ATCC 20892, cepas de *Mortierella schmuckerii*, cepas de *Cryptocodium cohnii*, cepas mutantes derivadas de cualquiera de los precedentes, y sus mezclas.

El tratamiento de las células incluye un tratamiento para liberar los lípidos mediante lisis, ruptura o permeabilización. Según se usan en la presente, los términos lisar, lisis, lisado, etc., se usarán genéricamente para referirse a un tratamiento para liberar lípidos intercelulares, incluyendo romper o permeabilizar las células. Preferiblemente, el tratamiento se selecciona del grupo que consiste en calentar las células, exponer las células a condiciones básicas, exponer las células a un compuesto quelante o sus combinaciones. Más preferiblemente, la lisis o ruptura de las células comprende calentar las células hasta al menos 50°C mientras se exponen las células a condiciones básicas, un compuesto quelante o sus mezclas.

Preferiblemente, la separación por gravedad comprende hacer pasar el caldo de fermentación que contiene los lípidos intercelulares liberados a través de una centrífuga, tal como centrífugas de tipo de discos apilados, de separador o de decantador.

45

La mezcla celular lisada separada comprende una capa pesada que comprende una solución acuosa que contiene los materiales sólidos resultantes de las células lisadas y una capa ligera que contiene lípidos. Las capas ligera y pesada se pueden separar mediante centrifugación. Los lípidos pueden estar presentes en un estado emulsionado. La capa ligera se puede lavar adicionalmente con una solución acuosa de lavado hasta que el lípido se vuelve sustancialmente no emulsionado. Preferiblemente, el tratamiento para romper la emulsión comprende mezclar la emulsión con agua, alcohol, acetona o sus mezclas y someter la mezcla a separación por gravedad. El procedimiento se realiza sin usar disolventes orgánicos apolares tales como hexano.

Cuando el procedimiento de extracción de lípidos de la presente invención incluye usar microorganismos procedentes de un procedimiento de fermentación, el procedimiento de extracción también puede incluir solubilizar al menos parte de los compuestos proteínicos en un caldo de fermentación al añadir una base seleccionada del grupo que consiste en hidróxidos, carbonatos, bicarbonatos, fosfatos y sus mezclas.

El procedimiento de la presente invención también puede incluir calentar los microorganismos hasta una temperatura de al menos aproximadamente 50°C. Preferiblemente, un compuesto químico, tal como una base, se añade al medio de cultivo para ayudar en la lisis de las células.

Como una alternativa al calentamiento, las células se pueden lisar con la ayuda de un compuesto quelante tal como EDTA. Además de ayudar en la lisis o la ruptura de las células, los queladores ayudan a prevenir la oxidación de los lípidos durante el procesamiento mediante quelación de (unión con) iones metálicos productores de radicales libres en el caldo de fermentación, tales como hierro o cobre. Formas preferidas de queladores son las que se consideran de calidad alimentaria o GRAS (generalmente reconocidas como seguras). Compuestos quelantes eficaces incluyen EDTA, ácido cítrico o citrato, ácido láctico, fosfato trisódico, polifosfato, hexametáfosfato, EGTA, DTPA, ácido fítico o CDTA y otras formas salinas de estos compuestos. En una realización, se añade EDTA sódico a las células para degradar las paredes celulares al quelar los cationes divalentes que ayudan a mantener unidas las paredes celulares. El procedimiento se puede realizar a temperaturas superiores con menos EDTA o temperaturas inferiores con concentraciones superiores de EDTA. Por ejemplo, se ha encontrado que las células ricas en DHA de *Schizochytrium* sp. se pueden permeabilizar y/o romper mediante la adición de EDTA a los cultivos al final del procedimiento de fermentación. Se requiere una concentración de 10.000 ppm para ayudar a romper las células a 30°C, una concentración de 5.000 ppm a 50°C y a temperaturas por encima de 70°C son eficaces concentraciones de menos de 1000 ppm.

Los queladores se pueden añadir al caldo de fermentación para hacer las células más fáciles de romper mediante procedimientos físicos tales como homogeneización. Además de un quelador, también se puede añadir agua para incrementar la presión osmótica interna a fin de lisar las células.

Preferiblemente, los microorganismos son capaces de crecer a un nivel de salinidad de menos de aproximadamente 12 g/l de cloruro sódico, más preferiblemente menos de aproximadamente 5 g/l de cloruro sódico y lo más preferiblemente menos de aproximadamente 3 g/l de cloruro sódico. Preferiblemente, los microorganismos son capaces de crecer a niveles de salinidad de menos de aproximadamente 7 g/l de sodio y menos de aproximadamente 250 mg/l de cloruro. Preferiblemente, el cloruro está presente en una cantidad de aproximadamente 70 a aproximadamente 150 mg/l.

Preferiblemente, los microorganismos comprenden al menos aproximadamente 20% en peso de lípido, más preferiblemente al menos aproximadamente 30% en peso, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 40%. Alternativamente, al menos aproximadamente 20%, más preferiblemente, al menos aproximadamente 20% del lípido es colesterol, fitosteroles, desmosterol, tocotrienoles, tocoferoles, ubiquinonas, carotenoides y xantofilas tales como beta-caroteno, luteína, licopeno, astaxantina, zeaxantina, cantaxantina y ácidos grasos tales como ácidos linoleicos conjugados y ácidos grasos altamente insaturados omega-3 y omega-6 tales como ácido eicosapentaenoico, ácido docosapentaenoico y ácido docosahexaenoico, ácido araquidónico, ácido estearidónico, ácido dihomogammalinolénico y ácido gammalinolénico o sus mezclas, preferiblemente al menos aproximadamente 30%, y más preferiblemente al menos aproximadamente 40%.

En un aspecto particular de la presente invención, los microorganismos son capaces de producir al menos aproximadamente 0,1 gramos por litro por hora de una mezcla de lípidos, que incluye preferiblemente colesterol, fitosteroles, desmosterol, tocotrienoles, tocoferoles, ubiquinonas, carotenoides y xantofilas tales como beta-caroteno, luteína, licopeno, astaxantina, zeaxantina, cantaxantina y ácidos grasos tales como ácidos linoleicos conjugados y ácidos grasos altamente insaturados omega-3 y omega-6 tales como ácido eicosapentaenoico, ácido docosapentaenoico y ácido docosahexaenoico, ácido araquidónico, ácido estearidónico, ácido dihomogammalinolénico y ácido gammalinolénico o sus mezclas, más preferiblemente al menos aproximadamente 0,2 g/l/h, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 0,3 g/l/h, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 0,4 g/l/h.

En otro aspecto de la presente invención, el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en algas, hongos, bacterias y protistas. Preferiblemente, los microorganismos son del orden Thraustochytriales. Más preferiblemente, los microorganismos se seleccionan del género *Thraustochytrium*, *Schizochytrium* y sus mezclas. Y lo más

preferiblemente, los microorganismos se seleccionan del grupo que consiste en microorganismos que tienen las características identificativas del número ATCC 20888, el número ATCC 20889, el número ATCC 20890, el número ATCC 20891 y el número ATCC 20892, cepas mutantes derivadas de cualquiera de los precedentes y sus mezclas. Preferiblemente, los microorganismos se seleccionan del grupo que consiste en microorganismos que tienen las características identificativas del número ATCC 20888 y el número ATCC 20889, y más preferiblemente el número ATCC 20888, cepas de *Mortierella schmuckeri*, cepas de *Cryptocodium cohnii*, cepas mutantes derivadas de cualquiera de los anteriores y sus mezclas.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama de flujo de una realización de un procedimiento de extracción sin disolvente de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se dirige a un procedimiento para extraer, recuperar, aislar u obtener lípidos de microorganismos. El procedimiento de la presente invención es aplicable a la extracción de lípidos que contienen ácidos grasos altamente insaturados omega-3, tales como ácido docosahexaenoico (DHA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y/o ácido docosapentaenoico (DPA) (es decir, la forma omega-3 de DPA), en particular lípidos que contienen una cantidad relativamente grande de DHA, procedentes de microorganismos que producen los mismos. Microorganismos ejemplares que producen una cantidad relativamente grande de ácidos grasos altamente insaturados omega-3 se divulgan en las Patentes de EE. UU. de cesionario común N° 5.340.594 y 5.340.742, ambas expedidas a favor de Barclay, y microorganismos ejemplares que producen una cantidad relativamente grande de ácido araquidónico se divulgan en la Patente de EE. UU. de cesionario común N° 5.583.019, expedida a favor de Barclay.

Sin embargo, por brevedad, esta descripción detallada de la invención se presenta con propósitos de comodidad e ilustración para el caso de extraer lípidos que comprenden ácido graso altamente insaturado omega-3 de microorganismos que producen los mismos, en particular extraer lípidos de microorganismos que producen una cantidad relativamente alta de DHA. Sin embargo, se ha de entender que la invención como un todo no pretende estar así limitada, y que un experto en la técnica identificará que el concepto de la presente invención será aplicable a otros microorganismos que producen una variedad de composiciones lipídicas según las técnicas analizadas en la presente. Estos microorganismos incluyen microorganismos tales como hongos, protistas, algas y bacterias, que producen una variedad de lípidos, tales como fosfolípidos; ácidos grasos libres; ésteres de ácidos grasos, incluyendo triglicéridos de ácidos grasos. Por brevedad, a menos que se indique otra cosa, el término "lípidos" se refiere a lípidos y/o compuestos asociados a lípidos.

Procedimientos de fabricación típicos de lípidos microbianos (en particular un aceite que contiene un ácido graso altamente insaturado omega-3 tal como DHA) implican hacer crecer microorganismos que producen DHA en un fermentador, aislar los microorganismos, secar la biomasa microbiana y extraer los lípidos intracelulares con un disolvente orgánico apolar, p. ej., hexano. Generalmente, el lípido extraído se refina adicionalmente para producir un lípido de alta pureza y/o calidad. El aislamiento de microorganismos implica diluir el caldo de fermentación con agua y centrifugar la mezcla para aislar microorganismos. Cuando los lípidos no se extraen inmediatamente o poco después de aislar los microorganismos, típicamente los microorganismos aislados se secan, por ejemplo, en una secadora de tambor, y se cierran herméticamente en un envase, p. ej., en bolsas cerradas herméticamente a vacío, para prevenir la degradación de lípidos. Desgraciadamente, el procedimiento de secado expone a los microorganismos a calor, lo que puede dañar, es decir degradar la calidad de, el lípido si se realiza incorrectamente. El envase puede desarrollar fugas, lo que puede degradar adicionalmente la calidad de los lípidos. Por otra parte, si los microorganismos secados no se tratan con un antioxidante, la exposición de microorganismos a aire y/o luz puede degradar adicionalmente los lípidos.

Recuperar el aceite en bruto directamente del caldo de fermentación evita estos problemas. Evitar la etapa de extracción con disolvente orgánico apolar reduce los costes de fabricación y también elimina la exposición del operario a los microorganismos secados, lo que puede provocar una respuesta alérgica en algunos individuos.

La presente invención proporciona un método para obtener lípidos de microorganismos usando un procedimiento de extracción sustancialmente libre de disolvente orgánico apolar, es decir un procedimiento de extracción "sin disolvente". Sin embargo, se pueden emplear disolventes en etapas aguas abajo tales como en un procedimiento de refinado. El procedimiento de la presente invención puede incluir obtener o aislar microorganismos, preferiblemente a partir de un procedimiento de fermentación. En contraste con los métodos actuales procedimientos de la técnica anterior tales como la extracción de aceites de habas de soja en los que las habas de soja se deben secar, el procedimiento de la presente invención no requiere una etapa de secado antes del procedimiento de extracción. Así, los procedimientos de la presente invención son aplicables a extraer lípidos de una biomasa microbiana que contiene al menos aproximadamente 10% en peso de agua atrapada, preferiblemente al menos aproximadamente

20%, más preferiblemente al menos aproximadamente 30%, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 50%. Cuando los microorganismos se obtienen a partir de un procedimiento de fermentación, el procedimiento de la presente invención puede incluir añadir una base al caldo de fermentación para disolver cualquier compuesto proteínico que pueda estar presente en el caldo. Las "bases" son sustancias que muestran reacciones alcalinas (básicas) en soluciones acuosas, es decir se ligan a protones y disocian iones hidróxido. La base debe ser suficientemente fuerte para hidrolizar o solubilizar al menos una porción de compuestos proteínicos que pueden estar presentes en el caldo. Las bases son útiles para solubilizar proteínas que son muy conocidas para un experto normal en la técnica de la química. Bases ejemplares que son útiles en los procedimientos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, hidróxidos, carbonatos y bicarbonatos de litio, sodio, potasio, calcio y carbonato magnésico. También se pueden usar otros compuestos muy básicos como sales de fosfato básicas, tales como fosfato trisódico.

El procedimiento de la presente invención incluye romper o lisar las células de microorganismos para liberar los lípidos que estén presentes dentro de las células. Las células se pueden lisar usando cualquiera de los métodos conocidos incluyendo químicos; térmicos; mecánicos, incluyendo, pero no limitados a, prensa francesa, molinos, ultrasonidos, homogeneización y explosión de vapor de agua; y sus combinaciones. En una lisis térmica de células, el caldo de fermentación que contiene microorganismos se calienta hasta que las células, es decir, las paredes celulares, de los microorganismos se degradan o rompen. Típicamente, el caldo de fermentación se calienta hasta una temperatura de al menos aproximadamente 50°C, preferiblemente al menos aproximadamente 75°C, más preferiblemente hasta al menos aproximadamente 100°C, y lo más preferiblemente hasta al menos aproximadamente 130°C. Un aspecto importante del procedimiento es mantener la temperatura por debajo de la temperatura a la que se pueden degradar los lípidos extraídos. Lisar térmicamente las paredes celulares de los microorganismos es particularmente útil para microorganismos cuyas paredes celulares están compuestas por proteínas. Durante este procedimiento, el espacio libre del fermentador se puede rellenar con nitrógeno u otro gas inerte para prevenir la oxidación de los lípidos mediante oxígeno.

Calentar el caldo también desnaturaliza proteínas y ayuda a solubilizar materiales orgánicos, incluyendo proteínas. La etapa de calentamiento del caldo de fermentación se puede alcanzar mediante cualquiera de los métodos conocidos, incluyendo el uso de un termointercambiador en línea, y preferiblemente al rociar vapor de agua en el caldo de fermentación y mantener el caldo a una temperatura deseada durante menos de aproximadamente 90 minutos, preferiblemente menos de aproximadamente 60 minutos, y más preferiblemente menos de aproximadamente 30 minutos.

El procedimiento de extracción sin disolvente de la presente invención también puede incluir separar al menos parcialmente el caldo de fermentación gastado de los lípidos. Típicamente, esto se alcanza al centrifugar, p. ej., al hacer pasar el caldo a través de una centrifuga de discos apilados, de separador o de decantador, y recoger los lípidos como una fase en emulsión. La centrifugación de la mezcla da como resultado una mezcla bifásica que comprende una capa pesada y una capa ligera. Típicamente, la capa pesada es una fase acuosa, que contiene la mayoría de los restos celulares. La capa ligera que contiene lípidos emulsionados se diluye a continuación con agua, se separa de nuevo en la mezcla bifásica y la capa ligera se aísla de nuevo. Este procedimiento de dilución con agua, separación y aislamiento (es decir, procedimiento de lavado) se puede alcanzar continuamente al alimentar agua y retirar la capa pesada a lo largo del procedimiento o se puede efectuar en etapas discretas. El procedimiento de lavado se repite generalmente hasta que se obtiene una capa lipídica sustancialmente no emulsionada, aunque pueden quedar pequeñas cantidades de emulsión. Se cree que la interfase aceite-agua de la emulsión está estabilizada por restos celulares residuales que se retiran mediante el procedimiento de lavado. Durante el procedimiento de lavado, la cantidad sucesiva de agua añadida se reduce para incrementar el contenido de lípidos. Mientras que reducir la cantidad de agua de alimentación demasiado rápidamente puede dar como resultado una pérdida de lípidos a la fase acuosa, reducir la cantidad de agua de alimentación demasiado lentamente da como resultado un procedimiento de lavado ineficaz. Se puede determinar fácilmente un grado apropiado de reducción del agua de alimentación al observar o analizar la capa acuosa separada. Generalmente, la capa lipídica, es decir, la capa ligera, tiene color; por lo tanto, en muchos casos se puede determinar un grado apropiado de reducción del agua de alimentación simplemente al analizar u observar el color de la capa acuosa que se separa de la capa lipídica.

Alternativamente, y preferiblemente, la emulsión se puede romper y el aceite recuperarse usando el procedimiento de desaceitado esbozado en el documento WO 96/05278. En este procedimiento, un compuesto hidrosoluble, p. ej., alcohol y/o acetona, se añade a la emulsión de aceite/agua para romper la emulsión y la mezcla resultante se separa mediante centrifugación. El lípido aislado se puede refinar adicionalmente usando un procedimiento similar al usado para refinar aceites vegetales estándar. Brevemente, el procedimiento de refinado de lípidos implica generalmente hidratar fosfolípidos al añadir ácido fosfórico al lípido seguido por añadir hidróxido sódico para neutralizar ácidos grasos libres. Estos compuestos se retiran a través de centrifugación. Esto es seguido a continuación por una etapa de lavado con agua para retirar adicionalmente cualesquiera cantidades restantes de fosfolípidos hidratados ("gomos") y ácidos grasos neutralizados ("pasta oleosa") en el lípido. El lípido resultante se blanquea usando Trysil™ y una arcilla blanqueadora estándar. También se añade ácido cítrico para retirar iones metálicos divalentes mediante quelación. A continuación, el Trysil™ y la arcilla blanqueadora se retiran a través de

filtración para producir lípido refinado. El lípido blanqueado se puede filtrar en frío para retirar compuestos de alto punto de fusión que pueden estar presentes en el lípido; sin embargo, esta etapa raramente se requiere.

5 El lípido resultante se puede refinar adicionalmente al retirar cualesquiera componentes de bajo peso molecular que puedan estar presentes. Típicamente, estos componentes se retiran al rociar con vapor de agua a altas temperaturas, bajo alto vacío. Este procedimiento también destruye cualesquiera enlaces peróxido que puedan estar presentes y reduce o elimina olores desagradables y ayuda a mejorar la estabilidad del aceite. A continuación, se puede añadir un antioxidante al lípido desodorizado resultante para mejorar la estabilidad del producto.

10 Durante el procedimiento de refinado, el lípido aislado se puede frigelizar para retirar compuestos de alto punto de fusión, tales como ácido grasos saturados. El procedimiento de frigelización implica generalmente disolver el lípido aislado en un disolvente orgánico, p. ej., hexano, enfriar la solución orgánica resultante, y filtrar la solución para retirar los componentes de alto punto de fusión de la fase de lípido o estearina. El procedimiento de frigelización produce generalmente un líquido transparente, especialmente cuando el lípido aislado sea turbio u opaco. Como se
15 apreciará, el uso de un disolvente tal como hexano es aceptable en procedimientos tales como el procedimiento de "refinado" descrito anteriormente. Alternativamente, el lípido aislado se puede refrigerar y las impurezas solidificadas se pueden separar por filtración, sin emplear un disolvente.

20 El procedimiento de refinado, blanqueo, desodorización esbozado anteriormente se usará para mezclas lipídicas ricas en triglicéridos. Alternativamente, o además de este procedimiento, otros lípidos, por ejemplo, pigmentos o carotenoides, se pueden separar y purificar, p. ej., mediante reparto en diversos disolventes, métodos cromatográficos, etc.

25 Aunque el procedimiento de la presente invención puede incluir aislar microorganismos de un procedimiento de fermentación, una de las ventajas de la presente invención es que permite que la fermentación de microorganismos y el aislamiento de lípidos se lleven a cabo en un solo recipiente. Por ejemplo, después de la fermentación, se puede añadir base al recipiente de fermentación y calentar la mezcla para lisar las células. Después de separar la fase en una capa pesada y una capa ligera, la capa ligera se puede transferir a otro recipiente para un procesamiento adicional o la capa pesada se puede retirar del recipiente de fermentación, por ejemplo, al drenar a través del fondo
30 del recipiente de fermentación, y la capa restante se puede procesar adicionalmente dentro del mismo recipiente de fermentación.

35 Si la concentración de lípidos en las células del cultivo microbiano es alta (p. ej., mayor de aproximadamente 20%) pero la concentración de células es baja (p. ej., menos de aproximadamente 40 g/l), como en células que crecen en sistemas de fermentación continua, o cultivos de células de crecimiento difícil (p. ej., frágiles), o cultivos producidos en sistemas de cultivo de base fotosintética, las células se pueden concentrar, p. ej., mediante centrifugación, filtración o sedimentación, antes de emplear los métodos de la invención si es necesario.

40 Objetivos, ventajas y nuevas particularidades adicionales de esta invención se harán evidentes para los expertos en la técnica al examinar los siguientes ejemplos de la misma.

Ejemplos

45 La reproducibilidad del procedimiento se caracterizaba por producir tres muestras de aceite completamente refinado usando aceite en bruto procedente del nuevo procedimiento de extracción sin disolvente. Una muestra extraída con hexano también se refinó completamente para servir como un control. Las etapas de fermentación, extracción y aislamiento de aceite se realizaron a gran escala, mientras que los estudios de refinado de aceite se realizaron a pequeña escala.

Las muestras de aceite completamente refinado se analizaron para demostrar la reproducibilidad del procedimiento.

Fermentación:

50 Un microorganismo rico en aceite (*Schizochytrium sp.*) se hizo crecer en un fermentador de 4542 l (1200 galones) para producir un caldo de fermentación para los siguientes procedimientos de extracción. Se usó una sola partida para generar el caldo de partida para los tres procedimientos de extracción sin disolvente. La fermentación se dejó avanzar durante 94 horas, mientras se controlan los niveles de glucosa a 13 g/l, tiempo después del cual se terminó la alimentación de jarabe de maíz. Los niveles de glucosa residuales caían hasta <5 g/l cuatro horas más tarde. Esto
55 daba como resultado una edad final de 98 horas. El volumen final del caldo era 3626 l (958 galones). El rendimiento final era 146 g/l de peso seco de células. Ni las comprobaciones de contaminación durante el procedimiento ni un análisis continuo de una muestra de caldo final mostraban signos de contaminación.

Muestra de Control Extraída con Hexano:

Una parte alícuota pequeña de caldo procedente de la partida de fermentación se secó en tambor y se extrajo con hexano para servir como una muestra de control. El producto intermedio de biomasa se recuperó usando una secadora de doble tambor. El análisis de este lípido se muestra en la Tabla 1.

5

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

Parámetro	Valor
Contenido de DHA (base de FAME)	35,7%
Contenido de aceite	62,7%
Índice de Peróxido (meq/kg)	2,6
Recuento de Placas Total (cfu/g)	<50
Contenido de DHA*	20,3%
Contenido de FAME	56,9%

* base en peso seco celular

Procedimiento de extracción sin disolvente:

10 Se obtuvo aceite en bruto al tratar tres partes alícuotas de 1514 litros (400 galones) (aprox.) del caldo de fermentación. Cada parte alícuota de 1514 litros (400 galones) procedente del fermentador se procesó separadamente, partiendo de las etapas de tratamiento cáustico/térmico. Cada parte alícuota se trató con 20 gramos de KOH al 45% por litro y se calentó hasta 130°C durante aproximadamente 30 minutos al hacer pasar vapor de agua a través del caldo de fermentación. El aceite en bruto se recuperó del caldo tratado usando una centrífuga de discos apilados Westfalia HFA-100 a escala comercial. Los resultados resumidos para diversos parámetros del procedimiento se presentan en la Tabla 2, y los resultados finales del análisis del aceite en bruto se muestran en la Tabla 3.

15

Tabla 2. Datos del Procedimiento procedentes del Procedimiento de Extracción sin Disolvente.

20

	SFE-1	SFE-2	SFE-3
Tratamiento del Caldo			
Volumen del Caldo Procesado	1090 l (288 gal)	1090 l (288 gal)	977 l (258 gal)
pH Tratado Final	7,5	8,0	8,7
Volumen Final después del Tratamiento Térmico	1469 l (388 gal)	1507 l (398 gal)	1166 l (308 gal)
Incremento de Volumen desde el Condensado	34,7%	38,2%	19,4%
Emulsión de 1^{er} Paso			
Volumen Total, 13 (gal)	681 (180)	503 (133)	564 (149)
Concentración de Aceite Est. (p/p)	12,0%	24,5%	16,1%
Densidad Aparente (g/ml)	0,986	0,991	0,999
Aislamiento del Aceite			
Aceite en Bruto Total Recuperado (1b)	182	165	174
Número de Lote Asignado al Aceite de DHA	SF1A	SF2A	SF3A

Tabla 3. Análisis de Lotes de Aceite de DHA procedentes del Procedimiento de Extracción sin Disolvente.

Parámetro	SF1A	SF2A	SF3A
Contenido de DHA (% de FAME)	39,0%	38,6%	39,2%
Índice de Peróxido (meq/kg)	4,6	1,8	2,0
Índice de Acidez (mg KOH/g)	N/D	N/D	N/D
Contenido de Humedad	N/D	N/D	N/D

Refinado:

5 Una muestra de cada parte alícuota de aceite en bruto se frigelizó, se refinó, se blanqueó y se desodorizó a pequeña
 10 escala, como una muestra del aceite en bruto procedente del control extraído con hexano. Datos diversos del
 procedimiento procedentes de estos experimentos a pequeña escala se muestran en la Tabla 4, incluyendo las
 15 eficacias de recuperación para las diversas etapas de procesamiento. Aunque es difícil interpretar demasiado de las
 eficacias de recuperación para procedimientos a escala de laboratorio, ya que las pérdidas tienden a ser
 desproporcionadamente grandes, los valores listados en la Tabla 4 muestran que los valores para las muestras
 extraídas sin disolvente tienden a encuadrar los valores medidos para el control extraído con hexano, siendo la única
 excepción la etapa de frigelización. Aunque la eficacia de recuperación durante la etapa de frigelización para el
 control de hexano era inferior que las observadas para las otras tres muestras, esta diferencia es insignificante
 desde una perspectiva estadística. Las altas pérdidas durante la etapa de frigelización hacían que también fuera
 inferior la eficacia de recuperación global para la muestra de control con hexano. No se esperaba que el rendimiento
 inferior tuviera un impacto significativo sobre la calidad global del aceite. Considerándolo todo, las diferencias en el
 procesamiento de las diversas muestras de aceite eran mínimas.

Tabla 4. Datos Diversos del Procedimiento procedentes de las Etapas de Refinado de Aceite.

	HEX-1	SF1A	SF2A	SF3A
Condiciones de Procesamiento				
Concentración Diversa	45,0%	52,9%	52,8%	45,0%
Velocidad de Rociado de Vapor de Agua	3,4%	3,4%	2,5%	2,2%
Eficacias de Recuperación				
Frigelización	80,6%	92,3%	87,7%	85,5%
Refinado	89,4%	84,8%	91,8%	95,0%
Lavado con Agua	90,6%	94,5%	95,8%	81,2%
Blanqueado	86,1%	89,2%	87,3%	84,1%
Desodorización	97,4%	96,1%	97,2%	97,5%
Envasado	88,2%	89,7%	89,3%	95,8%
Global	48,2%	56,9%	58,5%	51,8%

20 Muestras de aceite completamente refinado procedentes de las tres pruebas de extracción sin disolvente, y el
 control extraído con hexano, se analizaron y los resultados se muestran en la Tabla 5. También se muestran las
 correspondientes especificaciones de liberación para cada parámetro.

25 Una muestra del aceite en bruto de partida procedente de la prueba de extracción sin disolvente también se analizó
 con respecto al contenido de hierro. El contenido de hierro de esta muestra era 0,08 ppm. La concentración de los
 otros metales vestigiales estaba siempre por debajo de sus límites de detección respectivos.

Tabla 5. Resultados de QC para Aceite de RBD DHA procedente del Procedimiento de Extracción sin Disolvente en comparación con Aceite Extraído con Hexano.

Hexano		Procedimiento de Extrac. sin Disolvente		
ID Prueba N°	HEX-1	SFA1	SFA2	SFA3
Índice de Peróxido (meq/kg)	0,28	0,69	0,35	0,34
Índice de Acidez (mg KOH/g)	0,17	0,11	0,57	0,24
Humedad y Materias Volátiles	0,00%	0,06%**	0,00%	0,00%
Metales Vestigiales (ppm)				
Plomo	<0,20	<0,20	<0,20	<0,20
Arsénico	<0,20	<0,20	<0,20	<0,20
Hierro	0,22	0,21	0,56***	0,02
Cobre	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Mercurio	<0,20	<0,20	<0,20	<0,20
DHA (% de FAME)	36,9	37,3	37,0	37,7
DHA (mg/g de aceite)	342	345	343	351
Hexano (ppm)	<3	<3	<3	<3

5 * El valor se redujo hasta 0,22 mg KOH/g después de repetir las etapas de refinado y blanqueamiento

** Muestra analizada por the San Diego Fermentation Sciences Analytical Group.

*** El valor se redujo hasta <0,02 ppm después de repetir las etapas de refinado y blanqueamiento

10 Se muestra en la Tabla 6 una comparación más directa de los resultados de análisis medios para las tres muestras procedentes del procedimiento de extracción sin disolvente frente a los del control de hexano.

Tabla 6. Comparación de Valores Medios

Hexano		Extracción sin Disolvente			
Parámetro	Control	Media	Desv Estándar	CV	% Dif
Índice de Peróxido (meq/kg)	0,28	0,46	0,20	43,3%	64,3%
Índice de Acidez (mg KOH/g)	0,17	0,19*	0,06	33,3%	11,2%
Humedad y Materias Volátiles	0,00%	0,02%	0,03%	173%	ND
Metales Vestigiales (ppm)					
Plomo	<0,20	<0,20	N/A	N/A	0,0%
Arsénico	<0,20	<0,20	N/A	N/A	0,0%
Hierro	0,22	0,26	0,27	104%	18,2%
Cobre	<0,05	<0,05	N/A	N/A	0,0%
Mercurio	<0,20	<0,20	N/A	N/A	0,0%
Contenido de DHA (% de FAME)	36,9%	37,3%	0,4%	0,9%	1,1%
Contenido de DHA (mg/g)	342	346	4	1,2%	1,2%
Hexano (ppm)	<3	<3	N/A	N/A	0,0%

15 * Calculado usando el índice de acidez para la muestra reelaborada.

20 Los resultados de este experimento demuestran claramente que el procedimiento de extracción sin disolvente es reproducible y los lípidos procedentes de la extracción sin disolvente son relativamente indistinguibles de los lípidos obtenidos del procedimiento de extracción con hexano en cuanto a rendimiento del procedimiento y calidad del producto. El producto final del procedimiento de extracción sin disolvente es sustancialmente equivalente a los

lípidos procedentes de un procedimiento habitual de extracción basado en hexano, según se determina por las similitudes entre los perfiles de ácidos grasos y esteroides del producto procedente de estos dos procedimientos.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para obtener lípido que contiene un ácido graso altamente insaturado omega-3 a partir de microorganismos, que comprende:
- (a) lisar células de los microorganismos para producir una mezcla celular lisada;
- 5 (b) centrifugar dicha mezcla celular lisada para producir una mezcla separada en fases que comprende una capa pesada y una capa ligera, en donde dicha capa pesada comprende una solución acuosa y dicha capa ligera comprende dicho lípido;
- (c) separar dicha capa pesada de dicha capa ligera; y
 - (d) obtener dicho lípido de dicha capa ligera,
- 10 en donde el procedimiento se realiza sin usar un disolvente orgánico apolar.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha capa ligera comprende un lípido emulsionado.
3. El procedimiento según la reivindicación 2, que comprende además:
- 15 (e) añadir una solución de extracción acuosa a dicha capa ligera de la etapa (c); y
- (f) repetir dichas etapas (c), (d) y (e) hasta que dicho lípido se vuelva sustancialmente no emulsionado antes de dicha etapa (d).
4. El procedimiento según la reivindicación 2, en el que dicho lípido emulsionado comprende una suspensión de dicho lípido en una solución acuosa.
- 20
5. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha solución acuosa comprende materiales celulares sólidos.
6. El procedimiento según una cualquiera de la reivindicación 1 a 5, en el que dichos microorganismos se obtienen a partir de un procedimiento de fermentación.
- 25
7. El procedimiento según la reivindicación 6, que comprende además añadir una base a un caldo de fermentación.
8. El procedimiento según la reivindicación 7, en el que dicha base se selecciona del grupo que consiste en hidróxidos, carbonatos, bicarbonatos, fosfatos y sus mezclas.
- 30
9. El procedimiento según la reivindicación 6, que comprende además solubilizar al menos parte de los compuestos proteínicos en un caldo de fermentación.
- 35
10. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicha etapa (a) comprende calentar dichos microorganismos hasta una temperatura de al menos 50°C.
11. El procedimiento según la reivindicación 10, en el que dicha etapa (a) comprende calentar el caldo de fermentación hasta una temperatura de al menos 75°C.
- 40
12. El procedimiento según la reivindicación 11, en el que dicha etapa (a) comprende calentar el caldo de fermentación hasta una temperatura de al menos 100°C.
13. El procedimiento según la reivindicación 12, en el que en el que dicha etapa (a) comprende calentar el caldo de fermentación hasta una temperatura de al menos 130°C.
- 45
14. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que dicho microorganismo es capaz de crecimiento a un nivel de salinidad de menos de 12 g/l de cloruro sódico.
- 50
15. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que dicho microorganismo comprende al menos 20% en peso de lípido.
16. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que dicho microorganismo se selecciona del grupo que consiste en algas, hongos, bacterias y protistas.

17. El procedimiento según la reivindicación 16, en el que dichos microorganismos comprenden microorganismos del género *Mortierella*, el género *Crypthecodinium* y el orden *Thraustochytriales*.
- 5 18. El procedimiento según la reivindicación 17, en el que dichos microorganismos comprenden microorganismos del orden Thraustochytriales.
19. El procedimiento según la reivindicación 18, en el que dichos microorganismos se seleccionan del género *Thraustochytrium*, *Schizochytrium* y sus mezclas.
- 10 20. El procedimiento según la reivindicación 19, en el que dichos microorganismos se seleccionan del grupo que consiste en microorganismos que tienen las características de identificación de número ATCC 20888, número ATCC 20889, número ATCC 20890, número ATCC 20891 y número ATCC 20892, cepas de *Mortierella smuckerii*, cepas de *Chrythecodinium cohnii*, cepas mutantes derivadas de cualquiera de los precedentes y sus mezclas.
- 15 21. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-20, en el que dicho ácido graso altamente insaturado omega-3 se selecciona de ácido docosahexaenoico (DHA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y/o ácido docosapentaenoico (DPA)
- 20 22. El procedimiento según la reivindicación 21, en el que dicho ácido graso altamente insaturado omega-3 es DHA.

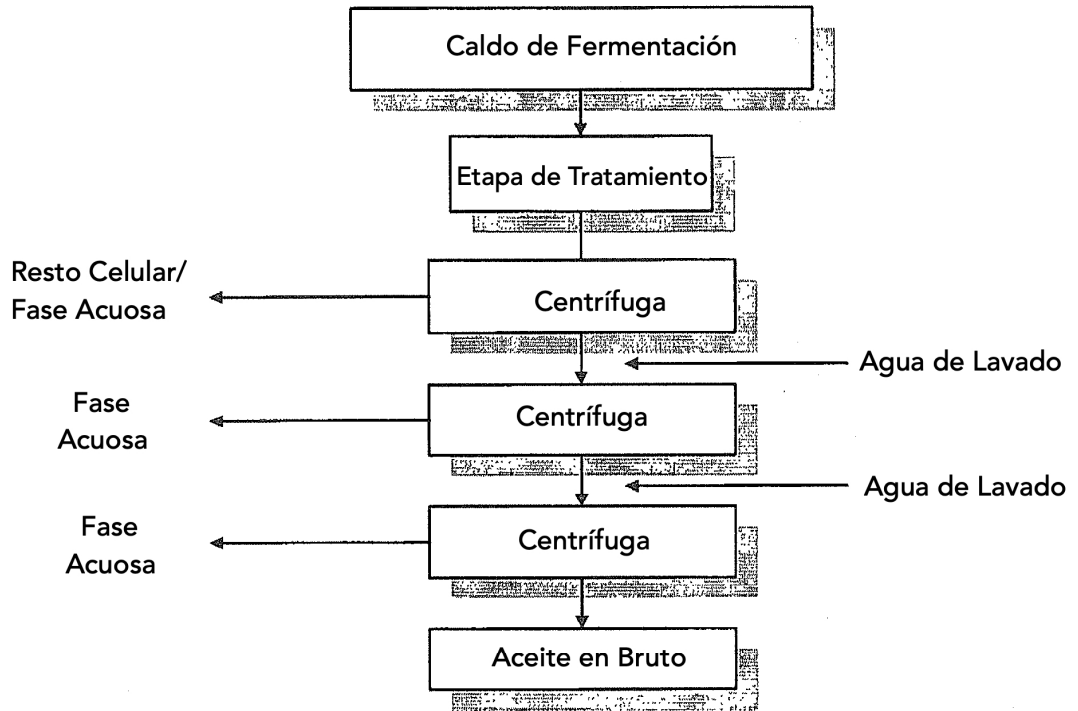


Figura 1