



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 224 264**

⑤① Int. Cl.⁷: **C12P 7/64**
// (C12P 7/64
C12R 1:645)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **97937813 .0**

⑧⑥ Fecha de presentación: **27.08.1997**

⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **0957173**

⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **17.11.1999**

⑤④ Título: **Procedimiento para preparar grasas o aceites que contienen ácidos grasos insaturados.**

③⑩ Prioridad: **30.08.1996 JP 23021096**

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2005

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2005

⑦③ Titular/es: **SUNTORY LIMITED**
1-40, Dojimahama 2-chome
Kita-ku, Osaka-shi, Osaka 530-8203, JP

⑦② Inventor/es: **Higashiyama, Kenichi;**
Akimoto, Kengo y
Shimizu, Sakayu

⑦④ Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 224 264 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 para preparar grasas o aceites que contienen ácidos grasos insaturados.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir aceites que contienen ácidos grasos insaturados con un bajo contenido de 24,25-metilencolest-5-en-3 β -ol, usando microorganismos que pertenecen al género *Mortierella*, subgénero *Mortierella*.

10 **Técnica relacionada**

Los microorganismos que pertenecen al género *Mortierella*, subgénero *Mortierella* son conocidos como microorganismos que producen ácidos grasos insaturados tales como el ácido araquidónico, ácido dihomo- γ -linolénico y ácido eicosapentanoico, y se han desarrollado procedimientos para la producción eficaz de ácido araquidónico, ácido dihomo- γ -linolénico y ácido eicosapentanoico por fermentación usando estos microorganismos (publicaciones de patentes japonesas sin examinar N° 63-44891, N° 63-12290, N° 63-14696, N° 5-91887, N° 63-14697). Adicionalmente también es conocido un procedimiento para producir ácido mead (ácido 5,8,11-eicosatrienoico) usando cepas mutantes que tienen reducida o defectuosa la actividad desaturante en $\Delta 12$, las cuales se obtienen por mutación de microorganismos que pertenecen al género *Mortierella*, subgénero *Mortierella* (publicación de patente japonesa sin examinar N° 5-91888).

Los ácidos grasos insaturados tales como el ácido dihomo- γ -linolénico, ácido araquidónico, ácido eicosapentanoico y ácido mead (ácido 5,8,11-eicosatrienoico) son precursores de las prostaglandinas, tromboxanos, prostaciclina y leucotrienos que tienen una actividad fisiológica potente y versátil, y por tanto se está dirigiendo mucha atención hacia los alimentos y piensos donde se añaden.

Por ejemplo, el ácido araquidónico se dice que es un precursor de las prostaglandinas, tromboxanos, prostaciclina y leucotrienos que presentan actividad fisiológica que incluye los efectos de contracción y relajación del músculo uterino, los efectos vasodilatador y antihipertensivo, etc., y las investigaciones recientes han progresado rápidamente sobre el ácido docosahexanoico (de aquí en adelante abreviado también "DHA") como un componente esencial particularmente para el desarrollo infantil.

Específicamente, Lanting *et al.* (LANCET, Vol. 344, 1319-1322 (1994)) han examinado niños desarrollados con leche materna y niños desarrollados con leche en polvo durante 3 semanas o más después de su nacimiento, con un seguimiento hasta los 9 años de edad, estudiando la incidencia de daño menor en los nervios craneales desde una perspectiva del comportamiento, y han publicado que la incidencia de daño cerebral en los niños desarrollados con leche en polvo es dos veces que la de los niños desarrollados con leche materna. Este asombroso resultado sugiere que los ácidos grasos insaturados superiores tales como DHA y ácido araquidónico que están presentes en la leche materna pero que están virtualmente ausentes en la leche en polvo infantil juegan un papel en el desarrollo del cerebro. Las subsiguientes publicaciones han mostrado también resultados que sugieren que los ácidos grasos insaturados superiores están conectados con el desarrollo del cerebro y la retina.

No obstante, aunque se considera que los aceites que contiene ácidos grasos insaturados son muy seguros, la cuestión de sus fuentes microbianas ha impedido un amplio uso a lo largo del mundo; mientras tanto, en LIPIDS, Vol. 27, N° 6, 481-483 (1992), se publicó que la *Mortierella alpina* 1S-4 produce 24,25-metilencolest-5-en-3 β -ol, lo cual en aquel momento no se conocía que sucediera de forma natural. Por tanto, se han querido desarrollar aceites que contienen ácidos grasos insaturados obtenidos a partir de microorganismos que pertenecen al género *Mortierella*, subgénero *Mortierella*, que se puedan utilizar de forma más segura para los alimentos y los piensos.

Shinmen *et al.*, en *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1989, volume 31, N° 1, pages 11-16, describen el ensayo de diferentes hongos de *Mortierella* en cuanto a su productividad de ácido araquidónico. El documento incluye la referencia al cultivo de diferentes cepas de *Mortierella* que incluye cepas procedentes del subgénero *Mortierella*. Los medios de crecimiento que se usaron se describieron en los primeros documentos, siendo uno de ellos un medio de crecimiento YM descrito por Yamada *et al.*, *Agric. Biol. Chem.* 51:785-790 (1987) que comprende glucosa-polipeptona, extracto de levadura y extracto de malta, siendo el otro un medio GY descrito por Shimizu *et al.*, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65:1455-1459 (1987) que comprende glucosa y extracto de levadura. Ninguno de estos dos primeros documentos se refiere al cultivo en un fermentador con aireación.

El documento WO 92/13086 describe procedimientos para la producción de aceites que contienen ácido araquidónico. El microorganismo preferido para el cultivo se considera que es *pythium insidiosum* pero en el Ejemplo 2 del documento se menciona un cultivo de *Mortierella alpina* en un frasco agitado que contiene un medio de patata-dextrosa.

65 **Descripción de la invención**

Es por tanto un objetivo de la presente invención proporcionar un aceite microorgánico que se pueda usar de forma segura en alimentos y piensos y que pueda proporcionar económica y establemente ácidos grasos insaturados.

Para resolver el problema descrito antes, en la presente invención se ha investigado un procedimiento para la producción eficaz de aceites con ácidos grasos insaturados con un bajo contenido de 24,25-metilenolest-5-en-3 β -ol, cuyo uso como alimento es todavía desconocido, y se ha estudiado en detalle la relación entre los diferentes componentes del medio y composiciones de esteroides, como resultado se ha encontrado que es posible obtener aceites con una baja proporción composicional de 24,25-metilenolest-5-en-3 β -ol usando una fuente de nitrógeno derivada de la soja para el cultivo de microorganismos que pertenecen al género *Mortierella*, subgénero *Mortierella*.

La presente invención proporciona un procedimiento para la producción de aceites que contienen ácidos grasos insaturados en los que la proporción composicional del 24,25-metilenolest-5-en-3 β -ol no es mayor que 35%, que comprende el cultivo de un microorganismo que pertenece al género *Mortierella*, subgénero *Mortierella* en un medio que contiene una fuente de nitrógeno derivada de soja desgrasada o soja desgrasada procesada física o químicamente en un fermentador con aireación, y la recogida de dicho aceite que contiene ácidos grasos insaturados del producto cultivado.

En otro aspecto, la invención proporciona un aceite que contiene ácidos grasos insaturados que tiene una proporción en la composición de 24,25-metilenolest-5-en-3 β -ol no mayor que 35% y obtenible por un procedimiento como el anterior, que contiene de 20 a 54% de ácido araquidónico. La invención proporciona también un aceite que contiene ácido araquidónico caracterizado por una proporción en la composición de 24,25-metilenolest-5-en-3 β -ol de 35% o menor y un contenido de ácido araquidónico de 20 a 54%, y obtenible por cultivo de un microorganismo que pertenece al género *Mortierella*, subgénero *Mortierella* en un fermentador con aireación.

La invención se refiere también a un suplemento nutritivo de la dieta, fórmula para niños prematuros, fórmula infantil, alimentos para bebés, productos para la alimentación de gestantes y piensos que contienen aceite como antes y a procedimientos para preparar tales sustancias comestibles incorporando un aceite como anteriormente.

Realización para llevar a cabo la invención

Según la invención, los ácidos grasos insaturados son ácidos grasos con al menos 16 átomos de carbono y al menos un doble enlace, entre los cuales los ácidos grasos insaturados superiores son ácidos grasos generalmente con al menos 18 átomos de carbono y al menos dos dobles enlaces, y como ejemplos se pueden mencionar el ácido γ -linolénico, ácido dihomo- γ -linolénico, ácido araquidónico, ácido eicosapentanoico y ácido mead (ácido 5,8,11-eicosatrienoico).

Como ejemplos de microorganismos que pertenecen género *Mortierella*, subgénero *Mortierella* según la invención se pueden mencionar *Mortierella elongata*, *Mortierella exigua*, *Mortierella hygrophila*, *Mortierella alpina*, etc., y específicamente se pueden mencionar *Mortierella elongata* IFO8570, *Mortierella exigua* IFO8571, *Mortierella hygrophila* IFO5941, *Mortierella alpina* IFO8568, ATCC16266, ATCC32221, ATCC42430, CBS219.35, CBS224.37, CBS250.53, CBS343.66, CBS527.72, CBS529.72, CBS608.70, CBS754.68 y otras líneas celulares.

Estas cepas son todas obtenibles sin restricción del instituto de fermentación, Osaka (IFO), American Type Culture Collection (ATCC) y Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS). También se puede usar la *Mortierella elongata* SAM0219 (FERM P-8703) (FERM-BP 1239) que se aisló de la suciedad por el grupo de investigación de la presente invención. Estos tipos de líneas celulares de cultivo o las líneas celulares aisladas de origen natural se pueden usar directamente, pero es posible obtener mediante el crecimiento y/o el aislamiento al menos una vez un mutante natural con diferentes propiedades que la línea celular original.

Los microorganismos usados según la invención incluyen cepas mutantes o cepas recombinantes de microorganismos que pertenecen al género *Mortierella*, subgénero *Mortierella* (cepas salvajes), es decir, las diseñadas para dar o bien un contenido de ácido graso insaturado superior en el aceite, o bien un contenido de aceite total superior, o ambos, comparado con la cantidad producida por la cepa salvaje original, cuando se cultiva usando el mismo sustrato.

También están incluidos los microorganismos diseñados para producir la misma cantidad de ácidos grasos insaturados que la cepa salvaje por medio del uso eficiente de un sustrato con un excelente efecto sobre el coste. Como ejemplos se pueden mencionar *Mortierella alpina* SAM1861 (FERM BP-3590) como una cepa mutante defectuosa en la actividad desaturante de $\Delta 12$ y la *Mortierella alpina* SAM1860 (FERM BP-3589) como una cepa mutante defectuosa en la actividad desaturante de $\Delta 5$.

Los microorganismos mencionados antes que pertenecen al género *Mortierella*, subgénero *Mortierella* en la forma de esporas, hifa o un precultivo obtenido mediante el cultivo previo se inoculan en un medio líquido o medio sólido y se cultivan. La fuente de carbono usada puede ser glucosa, fructosa, xilosa, sacarosa, maltosa, almidón soluble, molasas, glicerol, manitol, ácido cítrico, almidón de maíz o cualquier otro convencional, pero son particularmente preferidos la glucosa, maltosa, fructosa, almidón de maíz, glicerol y ácido cítrico.

Según la invención, usando una fuente de nutrientes obtenida de la soja como fuente de nitrógeno es posible bajar la proporción composicional del 24,25-metilenolest-5-en-3 β -ol en el aceite.

La fuente de nitrógeno derivada de la soja usada en la invención tiene un contenido de nitrógeno de al menos 2% en peso, preferiblemente al menos 3% en peso y más preferiblemente al menos 5% con respecto a los componentes totales excepto el agua. La fuente de nitrógeno derivada de la soja puede ser una o una combinación de diferentes tipos

ES 2 224 264 T3

de soja desgrasada o soja sometida a tratamiento con calor; tratamiento ácido; tratamiento con álcalis; tratamiento enzimático; modificación química; desnaturalización y/o renaturalización por procedimientos químicos y/o físicos que incluyen tratamiento con calor, tratamiento ácido, tratamiento con álcalis, tratamiento enzimático, modificación química, etc; separación de una parte de los componentes con agua y/o disolventes orgánicos; separación de una parte de los componentes por filtración y/o centrifugación; congelación; trituración; secado; tamizado; etc, o un producto de procesado de la misma manera que la soja no desgrasada; como candidatos comunes se pueden mencionar soja, soja desgrasada, copos de soja, proteína de soja comestible, okara, leche de soja y harina de soja tostada (kinako), entre los cuales son particularmente preferidos la soja desgrasada desnaturalizada con calor, y especialmente la soja desgrasada desnaturalizada con calor de la que se han eliminado además los componentes solubles en etanol.

Cuando sea necesario se pueden añadir también una o más fuentes diferentes de nitrógeno adicionales ya que la composición de esteroides no se ve notablemente afectada, y ejemplos incluyen fuentes de nitrógeno orgánicas tales como peptona, extracto de levadura, extracto de malta, extracto de carne, ácido casamínico, licor de maíz macerado y urea, y fuentes de nitrógeno inorgánicas tales como nitrato de sodio, nitrato de amonio y sulfato de amonio.

Se pueden usar también, cuando sean necesarias, fuentes de nutrientes en trazas, que incluyen sales inorgánicas tales como fosfato de potasio, dihidrógenofostato de potasio y otras sales de fosfato, sulfato de amonio, sulfato de sodio, sulfato de magnesio, sulfato de hierro, sulfato de cobre, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, etc., y vitaminas.

Según la invención, la acumulación del ácido graso insaturado de interés se puede acelerar realizando el cultivo con adición de un sustrato para el ácido graso insaturado en el medio. El sustrato usado para el ácido graso insaturado puede ser, por ejemplo, un hidrocarburo tal como hexadecano u octadecano, un ácido graso tal como ácido oleico o ácido linólico o una sal, por ejemplo una de sus sales de sodio o potasio, o un éster de ácido graso tal como un éster etílico, éster de ácido graso y glicerol o un éster de ácido graso y sorbitano; o un aceite tal como aceite de oliva, aceite de soja, aceite de colza, aceite de semilla de algodón o aceite de cacahuete, y éstos se pueden usar solos o en combinaciones. La cantidad total del sustrato añadido es de 0,001 a 10% en peso, y preferiblemente de 0,5 a 10% en peso, con respecto al medio. Cualquiera de estos sustratos se puede usar también como la única fuente de carbono para el cultivo.

Las fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, sales inorgánicas, vitaminas y/o aditivos mencionados antes se pueden añadir al medio antes de comenzar el cultivo o al caldo de cultivo durante el mismo. Los componentes del medio se pueden añadir de una vez, o de forma continua o periódicamente con unas pocas adiciones. Los componentes del medio se pueden añadir cada uno sólo o como una mezcla. No hay restricciones particulares en las concentraciones de los componentes del medio ya que el crecimiento de las células no se inhibe. En la práctica, la fuente de carbono debe estar a una concentración de 0,1 a 30% en peso, preferiblemente de 1 a 15% en peso, y la fuente de nitrógeno debe estar a una concentración de 0,01 a 10% en peso, y preferiblemente de 0,1 a 5% en peso.

La temperatura del cultivo es de 5 a 40°C, y preferiblemente de 20 a 30°C, y el ácido graso insaturado se puede producir también por crecimiento de células cultivando de 20 a 30°C seguido por cultivo continuado de 5 a 20°C. Esta forma de control de la temperatura se puede emplear también para aumentar el rendimiento del contenido en ácidos grasos insaturados superiores que se producen. El pH del medio es de 4 a 10, y preferiblemente de 5 a 8, y se cultiva con aireación y agitación, se puede emplear cultivo con agitación o cultivo estático. El cultivo se lleva a cabo normalmente durante de 2 a 20 días, preferiblemente de 5 a 20 días, y más preferiblemente de 5 a 15 días.

Se puede usar un fermentador, especialmente un fermentador de cultivos con aireación y agitación o un fermentador de cultivos de inyección de aire para cultivos sumergidos con aireación para posibilitar la producción con rendimientos convenientes de aceites que contienen ácidos grasos insaturados como productos comerciales. En tales casos, el aceite que contiene ácidos grasos insaturados puede ser incluso más eficazmente producido manteniendo durante el cultivo una concentración de glucosa de al menos 0,3% en peso y/o una concentración media de glucosa de al menos 0,5% en peso, preferiblemente una concentración de glucosa de al menos 0,5% en peso y/o una concentración media de glucosa de al menos 0,7% en peso, y más preferiblemente una concentración de glucosa de al menos 0,5-5% en peso y/o una concentración media de glucosa de al menos 0,7-3% en peso, durante al menos 3 días después del comienzo del cultivo. Por ejemplo, se pueden producir 100 mg o más de ácido araquidónico, y preferiblemente 120 mg o más por cada gramo de células secas.

Por tanto, un aceite que es rico en el ácido graso insaturado deseado y pobre en 24,25-metilencolest-5-en-3 β -ol, se acumula en grandes cantidades en las células.

El aceite deseado se puede obtener según un método convencional a partir del caldo de cultivo tomado durante la producción del aceite mediante el cultivo de células o después de su esterilización, el caldo de cultivo obtenido al final del cultivo o después de su esterilización, o las células cultivadas de cualquiera de ellos, alternativamente en forma seca.

El aceite deseado se puede recoger de las células cultivadas por el siguiente método, por ejemplo.

Después de que se completa el cultivo, las células cultivadas se obtienen del caldo de cultivo por un medio de separación sólido/líquido convencional tal como centrifugación y/o filtración. Las células cultivadas preferiblemente se lavan, se rompen y se secan. El secado se puede lograr por secado por congelación o secado al aire. Las células secas

ES 2 224 264 T3

se someten preferiblemente a extracción con un disolvente orgánico preferiblemente bajo una corriente de nitrógeno. El disolvente orgánico usado puede ser éter, hexano, metanol, etanol, cloroformo, diclorometano o éter de petróleo, y se pueden obtener también resultados satisfactorios por extracción alternada con metanol y éter de petróleo o por extracción usando un sistema monocapa de cloroformo-metanol-éter.

5 Por separación del disolvente orgánico del extracto bajo presión reducida, es posible obtener un aceite que contiene ácidos grasos insaturados en una alta concentración. La extracción se puede lograr también usando células húmedas, en su lugar o por el método descrito antes. En este caso se usa un disolvente compatible con agua tal como metanol o etanol, o un disolvente mixto compatible con agua que incluye uno de estos con agua y/o otro disolvente. Los otros procedimientos son los mismos que los descritos antes.

10 El aceite obtenido de esta manera contiene los ácidos grasos insaturados en un estado de triglicéridos y fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina o fosfatidilinositol, pero la mayoría del aceite está en la forma de triglicéridos. Para separar y purificar los triglicéridos que contienen ácidos grasos insaturados del aceite que contiene ácidos grasos insaturados recogido del producto cultivado, se puede usar un método convencional para la extracción con hexano seguido de tratamiento de desacidificación, decoloración, desodorización y desgomado, o separación por enfriamiento.

15 Según la invención, la proporción composicional del 24,25-metilencolest-5-en-3 β -ol se determina por el siguiente método basado en el análisis de la composición de esteroides.

20 Se explicará primero el análisis de la composición de esteroides. Una porción de 30 a 80 mg del aceite se pesa dentro de un tubo de ensayo con un tapón, se añaden 4 ml de metanol y 1 ml de hidróxido de potasio acuoso al 33%, y se ajusta el tapón. Después de reacción durante una hora mientras se agita suavemente a 80°C, la mezcla se deja enfriar y se extraen los componentes solubles en aceite con hexano. La solución de hexano resultante se lava con agua hasta que el indicador de fenoftaleína no colorea la capa acuosa, y después se concentra a presión reducida para obtener una muestra analítica. La muestra analítica se disuelve en una pequeña cantidad de hexano y se somete a cromatografía de gases en las condiciones listadas en la tabla posterior. Comparando el cromatograma de gases con un desmosterol estándar comercialmente disponible, se identifica los picos del desmosterol.

30 Los componentes que se detectan de 0,8 a 2,0 veces el tiempo de retención del desmosterol son los componentes esteroides, y las áreas de los picos de los cromatogramas de gas para todos los componentes de esteroides dentro del tiempo de retención se determinan por un método convencional. La proporción del área del pico de cada componente a la suma de las áreas totales de los picos de los componentes se toma como la proporción composicional de cada componente. Por ejemplo, la proporción del área del pico detectada para el desmosterol con respecto a la suma del área total del esteroide es la proporción composicional del desmosterol. El 24,25-metilencolest-5-en-3 β -ol se detecta en un tiempo de retención de 1,07 a 1,12 veces el tiempo de retención del desmosterol. La proporción del área del pico detectada para el 24,25-metilencolest-5-en-3 β -ol con respecto a la suma de todas las áreas de los picos es la proporción composicional del 24,25-metilencolest-5-en-3 β -ol.

40 Columna usada: ULBON HR-1 (diámetro interno: 0,25 mm, longitud: 25 m)

Temperatura de la columna: 280°C

45 Temperatura de entrada y del detector: 300°C

Vehículo del gas y presión del indicador, helio: 1,2 kg/cm²

Composición del gas y caudal, nitrógeno: 70 ml/minuto

50 Detector FID

Proporción de separación: 20

55 El aceite que contiene ácidos grasos insaturados de la invención tiene una proporción composicional de 24,25-metilencolest-5-en-3 β -ol de 35% o menor, preferiblemente 33% o menor, o más preferiblemente 30% o menor, y/o la proporción de 24,25-metilencolest-5-en-3 β -ol es 1,2 o inferior, preferiblemente 0,9 o inferior y más preferiblemente 0,6 o inferior con respecto al desmosterol presente en el aceite. El desmosterol es un componente incluido con el 24,25-metilencolest-5-en-3 β -ol en aceites obtenidos por cultivo de microorganismos que pertenecen al género *Mortierella*, subgénero *Mortierella*, y se sabe que está presente en la leche materna.

60 Como ejemplo de un aceite que contiene ácidos grasos insaturados según la invención se puede mencionar un aceite que contiene ácido araquidónico con 20 a 54% en peso y preferiblemente de 30 a 50% en peso de ácido araquidónico con respecto al total de los ácidos grasos en el aceite, y una proporción composicional de 24,25-metilencolest-5-en-3 β -ol de 35% o inferior, preferiblemente 33% o inferior y más preferiblemente 30% o inferior y/o una proporción de 24,25-metilencolest-5-en-3 β -ol de 1,2 o inferior, preferiblemente 0,9 o inferior y más preferiblemente 0,6 o inferior con respecto al desmosterol presente en el aceite.

Las propiedades del aceite que contiene ácido araquidónico son tales que el contenido de triglicérido es 90% o

ES 2 224 264 T3

superior, el contenido de humedad es 0,1% o inferior, el valor ácido es 0,5 o inferior y el valor de peróxido es 5 o inferior, mientras que el color es ≤ 50 amarillo y ≤ 10 por el método de Lovibond en una célula de 133,4 mm, y la composición del ácido graso es de 20 a 54%, preferiblemente con 30 a 50% de ácido araquidónico, 0,2 a 0,7% de ácido mirístico, 10 a 16% de ácido palmítico, 4 a 10% de ácido esteárico, 5 a 15% de ácido oleico, 5 a 15% de ácido linólico, 1 a 5% de ácido γ -linolénico, 0,1 a 2% de ácido α -linolénico, 1 a 6% de ácido dihomo- γ -linolénico, 0 a 1% de ácido eicosapentanoico y 2 a 7% de ácido lignocérico.

El aceite es rico en la forma de triglicérido del ácido araquidónico, y o bien no contiene ácido eicosapentanoico o bien lo contiene sólo en una cantidad en trazas, y es por tanto deseable como material para alimentos, y especialmente para fórmulas para niños prematuros, fórmulas infantiles, alimentos para bebés y alimentos para gestantes. El aceite que contiene ácidos grasos de la invención se puede usar también de forma segura en alimentos y piensos debido a su bajo contenido de 24,25-metilencolest-5-en-3 β -ol, cuya uso como alimento todavía no se ha establecido.

Ejemplos

La presente invención se explicará ahora en más detalle por medio de ejemplos.

Ejemplo 1

Usando la *Mortierella elongata* IFO8570 como la línea celular para producir ácido araquidónico, se colocaron 1400 l de un medio que contenía glucosa al 2%, proteína de soja comestible al 1% (nombre comercial: Esusan Meat, producto de Ajinomoto Co.) y aceite de colza al 0,1% en un equipo fermentador de 2000 l equipado con un agitador y un aireador y el cultivo con aireación y agitación se inició en condiciones de 28°C de temperatura, 1,0 vvm de aireación, 80 rpm de agitación y 1,0 kg/cm²G de presión en el espacio de cabeza. La concentración de glucosa se mantuvo a 1,5% por alimentación con glucosa, y después de cultivo durante 7 días se recuperaron las células por filtración y se sometieron a extracción del aceite. Como ejemplo comparativo, el cultivo y la extracción del aceite se llevaron a cabo de la misma manera usando extracto de levadura al 1% en vez de proteína de soja comestible.

Al analizar la composición de esteroides del aceite resultante según el procedimiento descrito antes, se detectó desmosterol a un tiempo de retención de aproximadamente 9,6 minutos y el 24,25-metilencolest-5-en-3 β -ol se detectó a un tiempo de retención de aproximadamente 10,5 minutos. En el ejemplo comparativo, se detectó desmosterol a un tiempo de retención de aproximadamente 6,5 minutos y el 24,25-metilencolest-5-en-3 β -ol se detectó a un tiempo de retención de aproximadamente 7,2 minutos. Los resultados se muestran en la tabla 1. Por tanto, se obtuvo un aceite que contiene ácido araquidónico con una baja proporción composicional de 24,25-metilencolest-5-en-3 β -ol.

TABLA 1

| | proporción composicional de 24,25-metilencolest- 5-en-3 β -ol (A) | proporción composicional del desmosterol (B) | A/B | Contenido total de esteroides [*] | Contenido de ácido araquidónico ^{**} |
|------------------------|--|---|------|---|---|
| Ejemplo | 30 % | 65 % | 0,46 | 1 % | 8 % |
| Ejemplo comparativo | 65 % | 27 % | 2,41 | 1 % | 9 % |

^{*} contenido de esteroides en el aceite

^{**} contenido de ácido araquidónico con respecto al total de ácidos grasos en el aceite

Ejemplo 2

Se usó la *Mortierella alpina* CBS754.68 como la línea celular para producir ácido araquidónico, se colocaron 600 l de un medio que contenía glucosa al 4%, harina de soja tostada al 1,3% (kinako), extracto de levadura al 0,2% y aceite de oliva al 0,1% en un equipo fermentador de 1000 l equipado con un agitador y un aireador para el cultivo con aireación y agitación durante 5 días en condiciones de 24°C de temperatura, 1,0 vvm de aireación, 100 rpm de agitación y 0,5 kg/cm²G de presión en el espacio de cabeza, seguido de filtración y secado para recuperar las células y extracción con hexano para obtener un aceite. Como ejemplo comparativo, el cultivo se llevó a cabo de la misma manera usando un medio de glucosa al 4%, extracto de levadura al 1,5% y aceite de oliva al 0,1% para obtener un aceite. Tanto en el ejemplo como en el ejemplo comparativo se añadió glucosa al 1% en el segundo día de cultivo.

Al analizar la composición de esteroides del aceite resultante según el procedimiento descrito antes, se detectó desmosterol a un tiempo de retención de aproximadamente 10,2 minutos y el 24,25-metilencolest-5-en-3 β -ol se detectó a un tiempo de retención de aproximadamente 11,2 minutos. En el ejemplo comparativo, se detectó desmosterol a un

ES 2 224 264 T3

tiempo de retención de aproximadamente 6,4 minutos y el 24,25-metilenolest-5-en-3 β -ol se detectó a un tiempo de retención de aproximadamente 7,1 minutos. Los resultados se muestran en la tabla 2. Por tanto, se obtuvo un aceite que contiene ácido araquidónico con una baja proporción composicional de 24,25-metilenolest-5-en-3 β -ol.

5

TABLA 2

10

| | proporción composicional de 24,25-metilenolest- 5-en-3 β -ol (A) | proporción composicional del desmosterol (B) | A/B | Contenido total de esteroides ⁺ | Contenido de ácido araquidónico ^{**} |
|------------------------|---|---|------|---|---|
| Ejemplo | 25 % | 53 % | 0,47 | 1,2 % | 48 % |
| Ejemplo comparativo | 68 % | 16 % | 4,25 | 1,1 % | 46 % |

15

20

* contenido de esteroides en el aceite

** contenido de ácido araquidónico con respecto al total de ácidos grasos en el aceite

Ejemplo 3

25

Se usó la *Mortierella alpina* ATCC32221 y la *Mortierella alpina* ATCC42430 como la línea celular para producir ácido araquidónico, y se cultivó cada una. Después de colocar 25 l de un medio que contenía glucosa al 4%, polvo de soja desgrasada al 1,2%, hidrogenofosfato de potasio al 0,2% y aceite de soja al 0,1% en un equipo fermentador de 50 l equipado con un agitador y un aireador, el cultivo con aireación y agitación se llevó a cabo durante 5 días en condiciones de 28°C de temperatura, 1,0 vvm de aireación, 300 rpm de agitación y 1,0 kg/cm²G de presión en el espacio de cabeza, seguido de filtración y secado para recuperar las células y extracción con hexano para obtener un aceite de las células recuperadas.

30

35

Como ejemplo comparativo, el cultivo se llevó a cabo de la misma manera usando un medio de glucosa al 4%, polvo de levadura de cerveza al 1,2%, hidrogenofosfato de potasio al 0,2% y aceite de colza al 0,1% para obtener un aceite. Tanto en el ejemplo como en el ejemplo comparativo se añadió glucosa al 1% en el segundo día de cultivo. La composición de esteroides del aceite resultante se analizó según el procedimiento descrito antes. Los resultados se muestran en la tabla 3. Por tanto, se obtuvo un aceite que contiene ácido araquidónico con una baja proporción composicional de 24,25-metilenolest-5-en-3 β -ol.

40

TABLA 3

45

| | proporción composicional de 24,25- metilenolest-5-en- 3 β -ol (A) | proporción composicional del desmosterol (B) | A/B | Contenido total de esteroides ⁺ | Contenido de ácido araquidónico ^{**} |
|---|---|--|------|---|---|
| <i>Mortierella alpina</i> ATCC 32221 | 5 % | 67 % | 0,07 | 0,9 % | 25 % |
| Ejemplo comparativo | 37 % | 28 % | 1,32 | 0,8 % | 20 % |
| <i>Mortierella alpina</i> ATCC42430 | 5 % | 35 % | 0,14 | 0,9 % | 18 % |
| Ejemplo comparativo | 40 % | 25 % | 1,60 | 1,0 % | 18 % |

50

55

60

65

* contenido de esteroides en el aceite

** contenido de ácido araquidónico con respecto al total de ácidos grasos en el aceite

ES 2 224 264 T3

Ejemplo 4

Se usó la *Mortierella alpina* CBS754.68 como la línea celular para producir ácido araquidónico, se colocaron 1400 l de un medio que contenía glucosa al 2%, proteína de soja al 1,5% y aceite de soja al 0,1% en un equipo fermentador de 2000 l equipado con agitación y aireación, y el cultivo con aireación y agitación se inició en condiciones de 24°C de temperatura, 1 vvm de aireación, 80 rpm de agitación y 200 kPa de presión en el espacio de cabeza. La concentración de glucosa se mantuvo de 0,5 a 1,5% por alimentación con glucosa, y después de cultivo durante 7 días se recuperaron las células por filtración. Después de secar las células, se extrajeron con hexano, el aceite extraído se sometió a desacidificación, decoloración y desodoración, y se añadió tocoferol al 0,05% como antioxidante. El aceite resultante se analizó y se encontró que tenía la siguiente composición.

Resultados del análisis

| | | |
|----|---|-------|
| 15 | Contenido de triglicéridos: 95,6% | |
| | Humedad: 0,04% | |
| | Valor ácido: 0,08 | |
| 20 | Valor de peróxido: 2,16 | |
| | Color (método de Lovibond, células 133,4 mm): amarillo: 20,1, rojo: 1,4 | |
| | Composición de ácidos grasos: | |
| 25 | Ácido araquidónico | 44,4% |
| | Ácido mirístico | 0,6% |
| | Ácido palmítico | 14,6% |
| 30 | Ácido esteárico | 8,8% |
| | Ácido oleico | 6,3% |
| | Ácido linólico | 10,2% |
| | Ácido γ -linolénico | 3,2% |
| 35 | Ácido α -linolénico | 0,8% |
| | Ácido dihomo- γ -linolénico | 5,2% |
| | Ácido eicosapentanoico | 0,2% |
| | Ácido lignocérico | 4,8% |
| 40 | Contenido total de esteroides: | 1,0% |
| | Proporción composicional del 24,25-metilcolest-5-en-3 β -ol: | 24% |
| | Proporción composicional del desmosterol: | 67% |

Ejemplo 5

El aceite que contiene ácido araquidónico obtenido en el ejemplo 4 se mezcló apropiadamente con aceite de pescado y aceite vegetal para obtener un aceite esencial ajustado con ácidos grasos. Adicionalmente al aceite esencial ajustado con ácidos grasos, se prepararon los materiales crudos y los componentes listados a continuación para la formulación de 100 kg de fórmula infantil en polvo. Después de disolver, mezclar y refinar los materiales crudos según los métodos convencionales, se esterilizaron, se concentraron y se homogeneizaron, y después se secaron por pulverización para obtener la fórmula infantil en polvo.

Materiales crudos y componentes

| | | |
|----|--|---------|
| 55 | Caseína | 5,6 kg |
| | Concentrado de proteína del suero de la leche | 24,0 kg |
| | aceite esencial ajustado con ácidos grasos (compuesto principalmente por ácido linólico, ácido α -linolénico) | 25,0 g |
| 60 | Contenido de ácido araquidónico | 80 g |
| | Contenido de ácido docosahexanoico | 25 g |
| | Contenido de ácido eicosapentanoico | 10 g |
| | Sacáridos (lactosa y oligosacáridos) | 43,4 kg |
| 65 | Minerales y vitaminas | 2 kg |
| | Total | 100 kg |

ES 2 224 264 T3

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la producción de aceite que contiene ácidos grasos insaturados en el que la proporción de la composición de 24,25-metilencolest-5-en-3 β -ol no es mayor que 35%, que comprende cultivar un microorganismo que pertenece al género *Mortierella*, subgénero *Mortierella* en un medio que contiene una fuente de nitrógeno derivada de soja desgrasada o soja desgrasada procesada física o químicamente, en un fermentador con aireación, y recoger dicho aceite que contiene ácidos grasos insaturados del producto cultivado.
2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha fuente de nitrógeno derivada de soja desgrasada proporciona un contenido de nitrógeno de al menos 2% en peso con respecto a los componentes totales excluyendo el agua.
3. Un procedimiento según la reivindicación 2, en el que dicha fuente de nitrógeno proporciona un contenido de dicho nitrógeno de al menos 5% en peso.
4. Un procedimiento según las reivindicaciones 1, 2 ó 3, en el que la soja desgrasada de la fuente de nitrógeno ha sido procesada por tratamiento con calor; tratamiento ácido; tratamiento con álcalis; tratamiento enzimático; modificación química; desnaturalización y/o renaturalización por un procedimiento químico y/o físico que incluye dicho tratamiento; separación de una porción de los componentes con agua y/o disolventes orgánicos; separación de una porción de los componentes por filtración y/o centrifugación; congelación; trituración; secado; y/o tamizado.
5. Un procedimiento según las reivindicaciones 1, 2 ó 3, en el que dicha fuente de nitrógeno derivada de soja desgrasada procede de soja desgrasada que ha sido sometida al menos a desnaturalización con calor.
6. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho producto cultivado es un caldo de cultivo tomado durante la producción del aceite mediante el cultivo celular o después de su esterilización, un caldo de cultivo obtenido al final del cultivo o después de su esterilización, o células cultivadas recogidas de cualquiera de ellos, opcionalmente en forma seca.
7. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho fermentador está equipado con un agitador y un rociador de aire o es un fermentador con sistema de inyección de aire.
8. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el cultivo se lleva a cabo mientras se mantiene una concentración de glucosa de al menos 0,3% en peso y/o una concentración media de glucosa de al menos 0,5% en peso, durante al menos 3 días después del comienzo del cultivo.
9. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el cultivo se lleva a cabo durante un periodo de 2 a 20 días.
10. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ácido graso insaturado en dicho aceite es ácido γ -linolénico, ácido dihomo- γ -linolénico, ácido araquidónico, ácido eicosapentanoico y/o ácido mead (ácido 5,8,11-eicosatrienoico).
11. Un procedimiento según la reivindicación 10, en el que el aceite contiene de 20 a 54% de ácido araquidónico y su proporción composicional de 24,25-metilencolest-5-en-3 β -ol no es mayor que 35%.
12. Un procedimiento para preparar un suplemento nutritivo de la dieta, una fórmula para niños prematuros, una fórmula infantil, alimento para bebés, productos para la alimentación de gestantes o piensos, **caracterizado** por la incorporación de un aceite que contiene ácido araquidónico producido de acuerdo con la reivindicación 11 en dicho suplemento, fórmula, alimento o pienso.
13. Un aceite que contiene ácidos grasos insaturados que tiene una proporción en la composición de 24,25-metilencolest-5-en-3 β -ol no mayor que 35% y obtenible por un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que contiene de 20 a 54% de ácido araquidónico.
14. Un aceite que contiene ácido araquidónico **caracterizado** por una proporción en la composición de 24,25-metilencolest-5-en-3 β -ol de 35% o inferior y por un contenido de ácido araquidónico de 20 a 54%, y obtenible por el cultivo de un microorganismo que pertenece al género *Mortierella*, subgénero *Mortierella* en un fermentador con aireación.
15. Un aceite que contiene ácido araquidónico según la reivindicación 14, en el que en dicho cultivo se usa una fuente de nitrógeno derivada de la soja.
16. Un aceite que contiene ácido araquidónico según las reivindicaciones 13, 14 ó 15, **caracterizado** además porque la proporción en la composición de 24,25-metilencolest-5-en-3 β -ol está en una proporción no mayor que 1,2 con respecto a la proporción en la composición de desmosterol.
17. Un aceite que contiene ácido araquidónico según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, que es un

ES 2 224 264 T3

aceite microbiano obtenido de dicho microorganismo del género *Mortierella*, subgénero *Mortierella*.

18. Un suplemento nutritivo de la dieta, que comprende un aceite que contiene ácido araquidónico según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17.

5

19. Una fórmula para niños prematuros, fórmula infantil, alimento para bebés o productos para la alimentación de gestantes, que comprende un aceite que contiene ácido araquidónico según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17.

10 20. Un pienso que comprende un aceite que contiene ácido araquidónico según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65