

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 255 017**

51 Int. Cl.:

C12P 7/64 (2006.01)
A23C 9/152 (2006.01)
A23C 9/20 (2006.01)
A23L 33/12 (2006.01)
A23L 33/00 (2006.01)
A23K 20/158 (2006.01)
A23D 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.08.1997** **E 04012292 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **27.09.2017** **EP 1454990**

54 Título: **Procedimiento para producir aceites que contienen ácidos grasos insaturados**

30 Prioridad:

30.08.1996 JP 23021096

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente modificada:
09.02.2018

73 Titular/es:

SUNTORY HOLDINGS LIMITED (100.0%)
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/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 255 017 T5

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para producir aceites que contienen ácidos grasos insaturados

Campo de la invención

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

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 y similares, que tienen una actividad fisiológica potente y versátil, y por tanto se está dirigiendo mucha atención hacia los alimentos y piensos animales 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 infantil 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 infantil es dos veces 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 contienen 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 animales.

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 animales y que pueda proporcionar económica y establemente ácidos grasos insaturados.

Para resolver el problema descrito antes, en la presente invención se ha buscado un procedimiento para la producción eficaz de aceites con ácidos grasos insaturados con un bajo contenido de 24,25-metilencolest-5-en-3 β -ol, cuyo uso como alimentos 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 completado la presente invención con el hallazgo de que es posible obtener aceites con una baja proporción en la composición de 24,25-metilencolest-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 invención proporciona un aceite que contiene ácido araquidónico que es un aceite microbiano obtenido a partir de un microorganismo *Mortierella alpina*, que tiene una relación de composición de 24,25-metilencolest-5-en-3 β -ol en una proporción de 1,2 o menos con respecto a la relación de composición de desmosterol y un contenido de ácido araquidónico de 30 a 54%.

La invención también proporciona el uso del aceite anterior como material para preparar un suplemento dietético nutritivo, una fórmula para lactantes inmaduros, una fórmula para lactantes, un alimento para bebés, un producto alimenticio para el embarazo o pienso para animales que contiene el aceite.

5 Los microorganismos que pertenecen género *Mortierella*, subgénero *Mortierella* en la invención son *Mortierella alpina*, etc., y específicamente se pueden mencionar *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.

10 Estas cepas están todas disponibles sin restricción del instituto de fermentación, Osaka (IFO), American Type Culture Collection (ATCC) y Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS). 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.

15 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.

20 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.

25 Usando una fuente de nutrientes obtenida de la soja como fuente de nitrógeno es posible bajar la proporción en la composición del 24,25-metilencolest-5-en-3 β -ol en el aceite.

30 La fuente de nitrógeno derivada de la soja usada 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 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 procesamiento 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.

40 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.

45 Se pueden usar también, cuando sean necesarias, fuentes de nutrientes en trazas, que incluyen sales inorgánicas tales como fosfato de potasio, dihidrógenofosfato 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.

50 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.

55 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 me-

5 dio se pueden añadir de una vez, o de forma continua o periódica 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.

10 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 los 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.

15 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 0,5-5% en peso y/o una concentración media de glucosa de 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.

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

25 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, del caldo de cultivo obtenido al final del cultivo o después de su esterilización, o de 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.

30 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, o similares. Las células secas 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, éter de petróleo o similares, 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-agua.

35 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 mezclado compatible con agua que incluye uno de estos disolventes con agua y/o otro disolvente. Los otros procedimientos son los mismos que los descritos antes.

40 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.

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

50 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 solución 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 fenofaleína 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 dada posteriormente. Comparando el cromatograma de gases con un desmosterol estándar comercialmente disponible, se identifican los picos del desmosterol.

55 Los componentes que se detectan de 0,8 a 2,0 veces el tiempo de retención del desmosterol son los componentes

esteroles, 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 en la composición 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 en la composición 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 en la composición del 24,25-metilencolest-5-en-3 β -ol.

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

Temperatura de la columna: 280°C

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

Detector FID

Proporción de separación: 20

El aceite que contiene ácidos grasos insaturados de la invención puede tener una proporción en la composición de 24,25-metilencolest-5-en-3 β -ol de 35% o menor, preferiblemente 33% o menor, y más preferiblemente 30% o menor. 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.

El aceite que contiene ácidos grasos insaturados según la invención es un aceite que contiene ácido araquidónico con 30 a 54% en peso y preferiblemente con 30 a 50% en peso de ácido araquidónico con respecto al total de los ácidos grasos en el aceite, y puede tener una proporción en la composición de 24,25-metilencolest-5-en-3 β -ol de 35% o inferior, preferiblemente 33% o inferior y más preferiblemente 30% o inferior. 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.

Las propiedades del aceite que contiene ácido araquidónico son tales que el contenido de triglicérido es 90% o 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 30 a 54%, preferiblemente 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 insaturados de la invención se puede usar también de forma segura en alimentos y piensos animales 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 [Referencia]

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 en la composición de 24,25-metilencolest-5-en-3 β -ol.

Tabla 1

	Proporción en la composición de 24,25-metilencolest-5-en-3 β -ol (A)	Proporción en la composición 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 tiempo de retención de aproximadamente 6,4 minutos y el 24,25-metilencolest-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 en la composición de 24,25-metilencolest-5-en-3 β -ol.

Tabla 2

	Proporción en la composición de 24,25-metilencolest-5-en-3 β -ol (A)	Proporción en la composición 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%

* contenido de esteroides en el aceite

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

Ejemplo 3 [Referencia]

- Se usó la *Mortierella alpina* ATCC32221 y la *Mortierella alpina* ATCC42430 como las líneas celulares 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, se llevó a cabo el cultivo con aireación y agitación 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.

- 5 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 en la composición de 24,25-metilencolest-5-en-3 β -ol.

Tabla 3

	Proporción en la composición de 24,25-metilencolest-5-en-3 β -ol (A)	Proporción en la composición del desmosterol (B)	A/B	Contenido total de esteroides*	Contenido de ácido araquidónico**
<i>Mortierella alpina</i> ATCC32221	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%

10 * contenido de esteroides en el aceite

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

Ejemplo 4

- 15 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 se inició el cultivo con aireación y agitación 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.
- 20

Resultados del análisis

Contenido de triglicéridos: 95,6%

Humedad: 0,04%

Valor ácido: 0,08

- 25 Valor de peróxido: 2,16

Color (método de Lovibond, células de 133,4 mm): amarillo: 20,1, rojo: 1,4

Composición de ácidos grasos:

ácido araquidónico	44,4%
ácido mirístico	0,6%
ácido palmítico	14,6%
ácido esteárico	8,8%

ácido oleico	6,3%
ácido linólico	10,2%
ácido γ -linolénico	3,2%
ácido α -linolénico	0,8%
ácido dihomo- γ -linolénico	5,2%
ácido eicosapentanoico	0,2%
ácido lignocérico	4,8%

Contenido total de esteroides: 1,0%

Proporción en la composición del 24,25-metilencolest-5-en-3 β -ol: 24%

Proporción en la composición del desmosterol: 67%

Ejemplo 5

- 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 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

caseína	5,6 kg
concentrado de proteína del suero de la leche	24,0 kg
aceite esencial ajustado con ácidos grasos	25,0 g
(compuesto principalmente por ácido linólico, ácido α -linolénico)	
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
minerales y vitaminas	2 kg
TOTAL	100 kg

REIVINDICACIONES

1. Un aceite que contiene ácido araquidónico que es un aceite microbiano obtenido a partir de un microorganismo *Mortierella alpina*, que tiene una proporción en la composición de 24,25-metilencolest-5-en-3 β -ol en una proporción de 1,2 o menor con respecto a la proporción en la composición de demosterol, y un contenido de ácido araquidónico de 30 a 54%.
5
2. Uso de un aceite que contiene ácido araquidónico según la reivindicación 1, como material para producir un suplemento dietético nutricional que comprende el aceite.
3. Uso de un aceite que contiene ácido araquidónico según la reivindicación 1, como material para producir una fórmula para lactantes inmaduros, una fórmula para lactantes, un alimento para bebés o un producto alimenticio para el embarazo, que comprende el aceite.
10
4. Uso de un aceite que contiene ácido araquidónico según la reivindicación 1, como material para producir un pienso para animales que comprende el aceite.