



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 300 115**

51 Int. Cl.:
A23D 9/007 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **97943165 .7**

86 Fecha de presentación : **09.10.1997**

87 Número de publicación de la solicitud: **0956774**

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

54 Título: **Grasas comestibles que contienen ácido arachidónico y alimentos que contienen las mismas.**

30 Prioridad: **11.10.1996 JP 8-289172**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2008

73 Titular/es: **SUNTORY LIMITED**
1-40, Dojimahama 2-chome
Kita-ku, Osaka-shi, Osaka 530, JP
NIPPON SUISAN KAISHA, Ltd.

72 Inventor/es: **Higashiyama, Kenichi;**
Akimoto, Kengo;
Shimizu, Sakayu;
Doisaki, Nobushige y
Furihata, Kiyomi

74 Agente: **Isern Jara, Jaime**

ES 2 300 115 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

Grasas comestibles que contienen ácido arachidónico y alimentos que contienen las mismas.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un aceite [grasa] comestible que contiene ácido arachidónico obtenido de microorganismos que pertenecen al subgénero *Mortierella* del género *Mortierella* y son capaces de producir ácido arachidónico, pero que contiene pocas materias no saponificables. Esta invención se refiere también a alimentos que comprenden el aceite comestible que contiene ácido arachidónico, especialmente compuestos para la alimentación infantil.

En esta invención, "materias no saponificables" significa que éstas se originan en microorganismos. Por lo tanto, el término "materias no saponificables" en esta descripción indica sólo que se originan en microorganismos y están libres de las que se añaden artificialmente.

Antecedentes

El ácido arachidónico ha atraído la atención como precursor de la prostaglandina, el tromboxano, los leucotrienos, etc., las cuales tienen potentes y variadas acciones fisiológicas, entre ellas la contracción del músculo uterino, la relajación, la vasodilatación y la acción antihipertensora. Junto con el DHA (ácido docosahexaenoico) ha sido investigado extensiva e intensivamente de manera especial como una sustancia esencial para el crecimiento de los niños. Por ejemplo, Lanting y otro siguieron el crecimiento de niños hasta la edad de 9 años que habían sido alimentados con la leche de la madre o con leche en polvo para los niños durante más de 3 semanas después de su nacimiento, investigaron la incidencia de deterioros menores en el nervio craneal en aquellos niños en base a su comportamiento, etc. Y encontraron que la incidencia de encefalopatías en los niños alimentados con leche en polvo para niños era casi el doble de alta que en los alimentados con la leche materna [LANCET, vol. 344, 1319-1322 (1994)]. Este hecho sorprendente se supone que ha sido debido a la falta de ácidos grasos no saturados de cadena larga, tales como el DHA y el ácido arachidónico en la leche en polvo para niños, mientras que estos ácidos se hallan presentes en la leche materna, ácidos que pueden jugar un importante papel en el desarrollo del cerebro. Se han hecho muchos estudios para hacer que la leche en polvo para los bebés se parezca, tanto como sea posible, a la leche materna, que es el nutriente ideal para los bebés, aunque aquellos estudios se han concentrado en la investigación de la relación entre los nutrientes básicos, las vitaminas, los minerales, etc. presentes en la leche materna y la acción preventiva de infecciones de la misma. Últimamente la influencia de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga ha sido también objeto de interés. Además, recientemente se han publicado informes unos tras otros que indican que los ácidos grasos insaturados de cadena larga pueden jugar un papel en el desarrollo del cerebro y la retina de los recién nacidos. Esto da lugar a temas que atraen la atención en el campo de la nutrición de bebés y recién nacidos prematuros. Así, se ha deseado desarrollar abundantemente aceites que contienen ácido arachidónico y que puedan utilizarse con seguridad en los ingredientes de alimentos, en particular preparados para la alimentación de los bebés.

El ácido arachidónico se encuentra extensamente en los reinos animales, y ha sido aislado de los lípidos extraídos de la glándula adrenal y del hígado de animales. Sin embargo, como que tales órganos contienen el ácido sólo en pequeñas cantidades y grandes cantidades de órganos son difíciles de obtener, el aislamiento a base de dichos órganos es insuficiente para el suministro de ácido arachidónico. Se han propuesto procedimientos para producir el ácido arachidónico por cultivo de diversos microorganismos capaces de producirlo. Entre ellos los pertenecientes al género *Mortierella* se ha visto que producen aceite con un alto contenido de ácido arachidónico (solicitud de patente japonesa n° 44891/88 y n° 12290/88 publicada y no examinada). Aunque el aceite así producido se dice que es altamente saludable, no ha sido ampliamente aceptado a causa de que se origina en microorganismos. El aceite obtenido por el cultivo de los microorganismos pertenecientes a la especie *Mortierella alpina* comprende principalmente triglicéridos (casi el 70% en peso o más) y fosfolípidos, junto con materias insaponificables que incluyen el desmosterol. Está confirmado que el esteroide con estructura de ciclopropano que nunca se ha visto que exista en la naturaleza, en concreto, 24,25-metilenocolest-5-en-3 β -ol están contenidos entre las materias insaponificables [LIPIDS, vol. 27, n° 6, 481-483 (1992)], aunque toda la composición de las materias insaponificables del aceite no es conocida.

WO94/28913 se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden entre otros el ácido arachidónico. En ese documento se describe la producción de un aceite crudo que contiene un 45% de ácido arachidónico obtenido de un cultivo de *Mortierella alpina*.

En EP-A-0.726.321 (correspondiente a JP-A-8214893) se describe un procedimiento para la producción de un aceite que contiene hasta 41% de ácido arachidónico originado de la *Mortierella* sect. *Schmuckeri*.

WO92/13086 (correspondiente a JP-T-6505384) describe procedimientos para la producción de ácido arachidónico a partir de diferentes especies de hongos, preferentemente *Pythium insidiosum*.

La publicación NEW FOOD INDUSTRY, vol. 37, n° 9, Kengo A y Shimizu A se refiere a la producción de aceites y grasas que contienen ácido arachidónico producidos por una cepa de *Mortierella alpina* 1S-4.

EP-A-0.276.541 (correspondiente a JP-A-63044891) y EP-A-0.223.960 (correspondiente a JP-A-63012290) se refieren a procedimientos para la producción de ácido arachidónico y a lípidos que contienen ácido arachidónico originados por *Mortierella spec.*

5 Descripción de la invención

Los inventores pensaron que era deseable en la actualidad eliminar en lo posible aquellas sustancias que no han sido reconocidas como componentes de los alimentos o cuyas estructuras permanecen desconocidas, del aceite que contiene ácido arachidónico obtenido por cultivo de microorganismos pertenecientes al subgénero *Mortierella* del género *Mortierella*. Por lo tanto, esta invención pretende proporcionar un aceite comestible que contiene ácido arachidónico originado en microorganismos pertenecientes al subgénero *Mortierella* del género *Mortierella*, que contiene materias insaponificables y, sobre todo, la cantidad menor posible de esteroles con estructura de ciclopropano que nunca habían sido comidas, y siendo apropiadas para la producción de alimentos, en particular, preparaciones para bebés.

Los inventores han visto que es posible reducir el contenido del 24,25-metilenocolest-5-en-3 β -ol del aceite que contiene el ácido arachidónico obtenido por el cultivo de microorganismos generadores del ácido arachidónico pertenecientes al género *Mortierella* controlando las condiciones del cultivo. Este hallazgo ha dado a los inventores un nuevo objeto para la producción de un aceite que contiene el ácido arachidónico con una cantidad lo menor posible de sustancias que no han sido reconocidas como componentes de alimentos o cuyas estructuras permanecen desconocidas. Después los inventores han encontrado, como resultado de muchas investigaciones para alcanzar el objetivo antes expuesto, que es posible reducir el contenido de materias insaponificables y las sustancias que incluyen el esteroles con estructura de ciclopropano que no ha sido reconocido como componentes de alimentos o cuyas estructuras siguen siendo desconocidas sin ninguna influencia en el contenido de ácido arachidónico, cultivando microorganismos productores del ácido arachidónico pertenecientes al subgénero *Mortierella* del género *Mortierella* en un medio nutriente según el procedimiento convencional, recogiendo los microbios, recuperando el aceite abundante en ácido arachidónico de los microbios y refinando el aceite por una apropiada combinación de procesos convencionales para los aceites y grasas comestibles, tales como el desgomado, el tratamiento con álcalis, el blanqueo, la desodorización, etc. con el tiempo, los inventores han completado esta invención.

Por lo tanto, esta invención se refiere a un aceite comestible que contiene ácido arachidónico originado en microorganismos que contienen no más de 0,8% en peso de materias insaponificables y un 20% en peso o más de ácido arachidónico.

Además, la invención se refiere a un aceite comestible que contiene ácido arachidónico originado en microorganismos que contienen no más de un 0,6% en peso de materias insaponificables y un 20% en peso o más de ácido arachidónico.

Además, esta invención se refiere a un aceite comestible que contiene ácido arachidónico originado en microorganismos que contienen no más del 0,8% en peso, preferentemente no más del 0,6% en peso de materias insaponificables, 20% en peso o más de ácido arachidónico, y no más del 0,3% en peso, preferentemente no más del 0,15% en peso de 24,25-metilenocolest-5-en-3 β -ol.

Además, esta invención se refiere a alimentos como los preparados para bebés prematuros, preparados para bebés, alimentos infantiles y alimentos para embarazadas y madres lactantes definidos según las reivindicaciones 7 y 8, respectivamente, que contienen algo del aceite comestible arriba mencionado, y el uso del aceite comestible que contiene ácido arachidónico como ingrediente en alimentos o preparados.

El aceite de esta invención es un aceite de origen microorganismos obtenido de la preparación tras el cultivo de microorganismos productores de ácido arachidónico pertenecientes al subgénero *Mortierella* del género *Mortierella*, que contiene no más del 0,8% en peso, preferentemente no más del 0,6% en peso, más preferentemente no más del 0,5% en peso, de materias insaponificables basadas en el peso del aceite, y 20% en peso o más, preferentemente 30% en peso o más, más preferentemente el 35% en peso o más, de ácido arachidónico en base al peso del ácido graso total del aceite.

Es preferible que el aceite de esta invención contenga no más del 0,3% en peso, preferentemente no más del 0,15% en peso, más preferentemente no más del 0,04% en peso, de 24,25-metilenocolest-5-en-3 β -ol. También es preferible que el aceite de esta invención contenga un 70% en peso o más, preferentemente 90% en peso o más, más preferentemente el 92% en peso o más, de triglicéridos en el aceite.

Es preferible que el aceite de esta invención contenga no más del 0,1% de humedad, tenga el valor ácido del 0,5% o menos y valor peróxido de 5 o menos, presente un color de 50 o menos de amarillo y 10 o menos de rojo tal como se determina en una célula de 133,4 mm por el método de Rovibond, y contenga del 0,2 al 0,7% de ácido mirístico, del 10 al 16% de ácido palmítico, del 4 al 10% de ácido esteárico, del 5 al 15% de ácido oleico, del 5 al 15% de ácido linoleico, del 1 al 5% de ácido γ -linoleico, del 0,1 al 2% de ácido α -linoleico, del 1 al 6% de ácido dihomo- γ -linoleico, de 0 al 1% de ácido eicosapentaenoico, y del 2 al 7% de ácido lignocérico.

Los microorganismos utilizados para la producción del aceite de esta invención pertenecen al subgénero *Mortierella* del género *Mortierella*, y cualquiera de ellos puede usarse con tal que sean capaces de producir ácido arachidónico.

Los microorganismos están representados por *Mortierella elongata* IFO 8570, *Mortierella exigua* IFO 8571, *Mortierella hygrophila* IFO 5941, *Mortierella alpina* IFO 8568, ATCC 16266, ATCC 32221 ATCC 42430, CBS 219.35, CBS 224.37, CBS 250.53, CBS 343.66, CBS 527.72, CBS 529.72, CBS 528.72, CBS 608.70, CBS 754.68 y similares. Esas cepas están disponibles sin limitación en la Fundación Instituto de Fermentación de Osaka (IFO), Colección de Cultivos Tipo Americanos (ATCC) y Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS). Asimismo puede utilizarse la cepa aislada del suelo por los inventores, *Mortierella elongata* SAM 0219 (Instituto Nacional de Biociencia y Tecnología Humana Agencia de Ciencia y Tecnología Industrial, Ministerio de Comercio e Industria Internacional, 1-3 Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaragi-ken (japón), depositada el 19 de marzo de 1986, Acceso n° FERM BP-1239. Las cepas pertenecientes a estos tipos de cultivos o aisladas del mundo natural son utilizables como son y pueden utilizarse variantes espontáneas que se obtienen por una o más repeticiones de crecimiento y/o aislamiento de las cepas originales y tienen propiedades diferentes de las de las cepas originales.

Los microorganismos usados en esta invención incluyen asimismo las variantes y recombinantes de los microorganismos productores de ácido arachidónico pertenecientes al subgénero *Mortierella* del género *Mortierella* (cepas silvestres), esto es, las diseñadas de modo que el contenido de ácido arachidónico en el aceite pueda aumentarse y/o el contenido del aceite total pueda aumentarse respecto al producido por los microorganismos de la cepa silvestre original cuando se cultiva usando los mismos sustratos. Los microorganismos de esta invención incluyen además los diseñados de manera que puedan utilizar eficientemente los sustratos con altas relaciones coste-beneficio para producir ácido arachidónico como mucho como el obtenible con las correspondientes cepas silvestres.

Los microorganismos capaces de producir ácido arachidónico pueden cultivarse según los procedimientos convencionales. Por ejemplo, la espora, el micelio o el precultivo obtenidos por el cultivo preliminar de cepas de microorganismos se inoculan en un medio líquido o sólido común seguido por cultivo. Cuando se usa un medio líquido, pueden emplearse fuentes de carbono comunes, entre ellas glucosa, fructosa, xilosa, sacarosa, maltosa, almidón soluble, molazas de refinera, glicerol, manitol, ácido cítrico y almidón de maíz entre los cuales son especialmente preferibles glucosa, fructosa, maltosa, glicerol, ácido cítrico y almidón de maíz. Son fuentes de nitrógeno utilizables las fuentes de nitrógeno orgánico como peatona, extracto de levadura, extracto de malta, extracto de carne, ácidos de casamino, licor de remojo de maíz y urea, y fuentes de nitrógeno inorgánico como nitrato sódico, nitrato amónico y sulfato amónico.

El uso de una fuente de nutrientes derivada de la haba de soja como la fuente de nitrógeno puede reducir el contenido de 24,25-metilenocolest-5-en-3 β -ol en el aceite (la relación basada en el total de esterol en el aceite). Es preferible que la fuente de nitrógeno obtenida de la haba de soja, siendo utilizable en esta invención, contiene un 2% o más, más preferentemente 5% o más, de nitrógeno basado en los ingredientes diferentes de la humedad. Las fuentes de nitrógeno utilizables de la haba de soja incluyen la haba de soja exenta de grasas sin ningún otro posterior tratamiento o después de un tratamiento como el tratamiento térmico, tratamiento con ácidos, tratamiento con álcalis, tratamiento con enzimas; modificación química, desnaturalización y/o resnaturalización por tratamientos químicos y/o físicos incluyendo el tratamiento térmico, tratamiento con ácidos, tratamiento con álcalis, tratamiento con enzimas, modificación química, etc.; eliminación de algunos ingredientes por empleo de agua y/o disolventes orgánicos; eliminación de algunos ingredientes por filtración y/o centrifugación; congelación; pulverización; secado; tamizado, etc., y haba de soja no exenta de grasas después de tratamientos similares. Esas fuentes de nitrógeno pueden usarse solas o en combinación con algunas de ellas. Fuentes comunes son la haba de soja, la haba de soja exenta de grasas, copos de haba de soja, proteína de haba de soja para alimentos, residuo de cuajada de habas, leche de soja, haba de soja tostada y molida, etc. de las cuales es deseable la haba de soja exenta de grasas y desnaturalizada por el calor, y es más deseable usar haba de soja exenta de grasas tras su desnaturalización por el calor seguida de la eliminación de ingredientes solubles en el etanol.

Además, como nutrientes de traza pueden usarse, si es preciso, sales inorgánicas como los fosfatos, cloruro cálcico, cloruro magnésico, sulfato magnésico, sulfato férrico, sulfato de cobre y sulfato sódico, y también vitaminas. Estos nutrientes en el medio no se limitan particularmente por cuanto cada uno de ellos está contenido a una concentración tal que no inhibe el crecimiento del microorganismo. A efectos prácticos, la concentración preferida de la fuente de carbono es de 0,1 a 30% en peso, preferentemente de 0,5 a 15% en peso, más preferentemente del 1 al 15% en peso, mientras que la concentración preferida de la fuente de nitrógeno es del 0,01 al 10% en peso, preferentemente del 0,1 al 5% en peso. Se realiza un cultivo con centrifugación con aireación y agitación, un cultivo con agitación o un cultivo de duración a temperaturas de 5 a 40°C, preferentemente de 20 a 30°C, en un medio de pH 4 a 10 y preferentemente de 5 a 8, usualmente de 2 a 20 días.

Cuando se emplea un medio sólido, se utiliza salvado de trigo, paja de arroz o similar a la que se ha añadido de un 50 a un 100% en peso de agua para la incubación a temperaturas de 5 a 40°C, preferentemente de 20 a 30°C, durante 3 a 20 días. Pueden agregarse al medio, si hace falta, fuentes de nitrógeno, sales inorgánicas y/o nutrientes de traza.

Para aumentar la cantidad de ácido arachidónico producido, pueden agregarse un hidrocarburo como el exadecano o el octadecano; un ácido graso como el ácido oleico o el ácido linoleico o una sal de éstos como una sal de sodio o de potasio, o un ester de un ácido graso como el ester etílico, el ester del ácido graso de sorbitano, el ester de ácido graso de glicerol, o aceites o grasas como el aceite de oliva, aceite de semilla de algodón o aceite de coco, solos o en combinación como precursores del ácido arachidónico. Estos aditivos pueden agregarse de una vez o continuamente o en varias veces en lotes. Los hidrocarburos, ácidos grasos o las sales de éstos, o los aceites y grasas son deseables cuando se añaden antes del comienzo del cultivo, mientras que los ácidos grasos o las sales de éstos o bien los esteres de ácidos grasos o los aceites y grasas son deseables cuando se añaden durante el cultivo.

Tras el cultivo en las condiciones arriba mencionadas, se produce el lípido que contiene ácido arachidónico y se acumula en los microbios. Cuando se empleó un medio de cultivo líquido, el lípido que contiene ácido arachidónico se recupera de los microbios como sigue:

Después de completar el cultivo se recogen los microbios del medio de cultivo por medios de separación sólido-líquido convencionales, como la centrifugación y/o filtración, etc. Los microbios así recogidos se lavan preferentemente con agua se destruyen y se secan. Los microbios se secan por secado con congelación, secado al aire, etc. Los microbios secados se someten a extracción con un disolvente orgánico preferente mente en corriente de nitrógeno. Los disolventes orgánicos utilizables comprende el éter, exano, metanol, etanol, cloroformo, diclorometano, éter de petróleo, etc. También son posibles para alcanzar un buen resultado la extracción alternada con metanol y éter de petróleo, y la extracción con un sistema de disolvente de una capa consistente en cloroformo, metanol y agua. La evaporación del disolvente orgánico del extracto a presión reducida da un aceite que contiene el ácido arachidónico con una elevada concentración.

En lugar de los procedimientos arriba mencionados, para la extracción pueden emplearse microbios mojados. Los disolventes utilizables en este caso comprenden aquellos que son solubles en agua, como el metanol, etanol y similares, y las mezclas solubles en agua que contienen aquellos disolventes y agua y/o otros disolventes. Otros procedimientos son los mismos que se han mencionado más arriba.

El lípido que contiene ácido arachidónico así obtenido contiene principalmente triglicéridos (casi un 70% en peso o más) y fosfolípidos (no más del 30% en peso) y, además, materias insaponificables que incluyen el desmosterol. Las materias insaponificables contienen sustancias cuyas estructuras siguen siendo desconocidas o que no han sido reconocidas como componentes alimenticios, por ejemplo, esterol con estructura de ciclopropano, que no han sido reconocidos como componentes para la alimentación, concretamente, el 24,25-metilenocolest-5-en-3 β -ol.

El aceite de esta invención puede producirse por refinado del aceite que contiene ácido arachidónico obtenido por cultivo de los antedichos microorganismos productores del ácido arachidónico y pertenecientes al subgénero *Mortierella* del género *Mortierella*. Esto es, una vez se ha decidido el tipo de grasas a tratar y las sustancias a eliminar, pueden eliminarse las materias insaponificables que contienen esterol con estructura de ciclopropano y las sustancias cuya estructura permanece desconocida pueden eliminarse con una combinación apropiada de procedimientos comunes para el refinado de aceites y grasas comestibles, tales como desgomado, refinado con un álcali, blanqueo, desodorización, etc., sin ninguna influencia sobre el contenido de ácido arachidónico, desde el aceite que contiene el ácido arachidónico obtenido por cultivo de los microorganismos antes mencionados pertenecientes al género *Mortierella* y capaces de producir ácido arachidónico.

Para el refinado, en esta invención se emplea la cromatografía de columna. En esta invención se emplean la alúmina activada, el carbón activo, los tamices moleculares, la gel de sílice, la arcilla activada, la tierra de diatomeas, la gel de plata-sílice y/o las resinas de intercambio iónico. El aceite que contiene ácido arachidónico antes citado se refina usando el gel como material de relleno. A saber, el antes citado aceite que contiene ácido arachidónico y un disolvente orgánico como el exano, etanol, fluido super-crítico, etc., cuando se emplean como revelador son obligados a circular solos o como una mezcla de los mismos a un ritmo constante a través de la columna llena del gel de manera que las materias insaponificables y el aceite refinado puedan desarrollarse y eluirse. La cromatografía puede realizarse por el procedimiento de lecho movable simulado.

Tras la eliminación del disolvente orgánico por destilación, etc., el residuo se trata además con destilación al vapor. A saber, la destilación al vapor puede eliminar incluso los compuestos de aroma volátiles y las materias insaponificables que tienen bajos puntos de ebullición. Asimismo, una cantidad como traza del disolvente orgánico remanente que haya quedado tras el proceso de cromatografía puede eliminarse al mismo tiempo. Así se obtiene una composición de aceite comestible que contiene ácido arachidónico y está prácticamente libre de materias insaponificables. La cromatografía de columna puede combinarse con otro procedimiento bien conocido para el refinado, además de la destilación al vapor o la destilación fraccionada con un fluido supercrítico.

A causa del bajo contenido de 24,25-metilenocolest-5-en-3 β -ol que no ha sido reconocido como componente alimenticio, el aceite que contiene ácido arachidónico de esta invención puede usarse como ingrediente de alimentos. El tipo de alimento no está especialmente restringido, siendo un ejemplo de ello los alimentos que contienen aceites y grasas, incluyendo alimentos naturales que contienen aceites y grasas como la carne, el pescado y las nueces; alimentos a los que se agregan aceites y grasas durante la cocción, como platos chinos, fideos chinos, sopas, etc.; alimentos que emplean los aceites y grasas como medio de transferencia de calor, tales como *tempura*, fritadas, cuajada de alubias fritas, platos chinos de arroz frito, buñuelos, pasteles de masa fritos, etc.; alimentos grasos y alimentos preparados con aceites y grasas añadidos durante su preparación, como la mantequilla, la margarina, la mayonesa, las salsas de aliño, el chocolate, los fideos chinos de preparación rápida, el caramelo, el bizcocho, los helados, etc. y los alimentos con aceites y grasas rociados o aplicados durante el acabado, tales como el arroz frito, bizcocho duro, torta de mermelada de alubias, etc. Sin embargo, los alimentos no se limita a aquéllos que contienen aceites y grasas, sino que abarcan los alimentos de origen agrícola como el pan, los fideos, al arroz, los dulces, la cuajada de haba de soja y la cuajada de haba de soja tratada, alimentos de fermentación como el *sake*, el *sake* médico, el *sake* dulce (*mirin*), el vinagre, el miso, al aliño, etc., los alimentos de origen ganadero como el yogurt, el jamón magro, el jamón graso, las salchichas, la mayonesa, etc.; los alimentos de origen pesquero, como la pasta de pescado, la pasta de pescado frito, la pasta de pescado que contiene huevo rallado; bebidas como zumos de frutas, bebidas frescas, bebidas para deportistas, bebidas alcohólicas, té, etc.

Los aceites de esta invención son preferibles como materias primeras, especialmente para las preparaciones para bebés prematuros, preparaciones para bebés, alimentos para embarazadas y madres lactantes, debido a que los aceites contienen una baja proporción de 24,25-metilenocolest-5-en-3 β -ol que no ha sido reconocido como componente alimenticio, son ricos en ácido arachidónico en la forma de un triglicérico, y están libres de ácido icosapentanoico o, incluso así, contienen sólo una cantidad de trazas del ácido.

Además, el aceite de esta invención puede utilizarse en alimentos funcionales que incluyen alimentos para la salud para una aplicación determinada (o alimentos dietéticos), y la forma de presentación de esos alimentos puede ser la general, como cápsulas, gránulos, tabletas, bebidas o formas entéricas de alimentación.

Modo óptimo de poner en práctica la invención

Esta invención se explicará con mayor detalle haciendo referencia a los ejemplos que siguen. Debe observarse que la invención no se limita a estos ejemplos.

Ejemplo Inventivo 1

Se inoculó *Mortierella alpina* CBS 754.68 como microorganismo productor de ácido arachidónico en un recipiente de cultivos de 2000 cm³ con 1400 cm³ de medio de cultivo que contenía un 2% de glucosa, 1% de extracto de levadura y un 0,2% de aceite de haba de soja y se inició el cultivo con aireación y agitación a 28°C con aireación a 1,0 vvm, grado de agitación 9° rpm, siendo la presión interna del recipiente 1,0 kg/cm²G. La concentración de la glucosa se mantuvo al 1,5% por el sistema de realimentación y los microbios se recogieron por filtración tras el cultivo de 7 días, para dar 25 kg de microbios secos. Después se agregaron 5 l de exano a 1 kg de los microbios secos así obtenidos y la mezcla se agitó suavemente durante 30 minutos. A seguido, el filtrado obtenido por filtración de aspiración se sometió a evaporación en un evaporador giratorio para eliminar el disolvente, dando 500 g de extracto de aceite crudo.

Se llenó una columna abierta de 450 g de gel de sílice. El extracto de aceite crudo, 590 g, se diluyó cinco veces con exano y se refinó a través de la columna, seguido de la evaporación del exano, para dar 450 g de aceite tratado en la columna. Después el aceite se sometió a una destilación al vapor para su desodorización, seguido de la adición de 0,04% de tocoferol como agente antioxidante, para dar un aceite refinado.

Ejemplo Comparativo 1

Se efectuó una extracción de la misma manera que en el Ejemplo 1, pero el extracto no se trató con la columna, seguido de una destilación al vapor para su desodorización, dando un aceite refinado tras adición de un 0,04% de tocoferol.

Cuantificación de materias insaponificables

El aceite refinado obtenido en el ejemplo inventivo 1 y que en el ejemplo comparativo 1 fue analizado para ver su contenido de materias insaponificables se sometió al procedimiento siguiente. Los resultados se exponen en la Tabla 1.

En esta invención, el contenido de materias insaponificables significa la cantidad residual tras la substracción de la cantidad de ácidos grasos contaminados de la cantidad de sustancias extraídas con un disolvente usado en un análisis cuantitativo tras la saponificación del aceite de acuerdo con el proceso de cuantificación de materias insaponificables, que se especifica en los Métodos Normalizados para el Análisis de Grasas, Aceites y materias afines, de la Sociedad de Químicos del Petróleo del Japón, expresándose la cantidad residual por porcentaje respecto a la cantidad de la muestra. La cantidad de Materias Insaponificables agregadas tras el refinado, como el tocoferol, debe substraerse.

El método antes mencionado se expresa a continuación (ver “Yukagaku (Química del Petróleo)”, Revista de la Sociedad de Químicos del Petróleo de Japón, 13, 489 (1996).

Se pesan unos 5 g de una muestra en un frasco, de añaden 50 ml de hidróxido potásico 1N-etanólico y se hierve suavemente durante 1 hora para su saponificación. Se deja de calentar cuando ha terminado la saponificación, se transfiere el líquido tras la saponificación a un embudo separador junto con el lavado del frasco de saponificación con 100 ml de agua caliente, se añaden 50 ml de agua y se deja enfriar la mezcla hasta la temperatura ambiente. Se añaden 100 ml de éter etílico al embudo separador mientras se lava el frasco de saponificación con el éter etílico, se tapa perfectamente el embudo, se agita vigorosamente durante 1 minuto, y se deja reposar hasta que se separen claramente dos capas. Se transfiere la capa inferior a un tercer embudo tras la separación en dos capas y se repite la extracción similarmente con 50 ml de éter etílico.

Se transfiere las capas de éter etílico del segundo y el tercer embudos al primer embudo mientras se lavan aquellos embudos con una pequeña cantidad de éter etílico, se agregan 30 ml de agua, se agita y después se deja reposar hasta su separación en dos capas y se elimina la capa inferior. Se repite el proceso de agitación y de reposo para su fraccionamiento con 30 ml de agua añadidos cada vez, y se lavan los extractos hasta que el agua fraccionada ya no muestre coloración con el indicador de fenoltaleína. Se deshidrata el extracto de éter etílico lavado con sulfato sódico (anhidro) a discreción, se filtra con un papel de filtro seco, se transfiere el filtrado a un frasco de destilación.

ES 2 300 115 T3

Los recipientes, los papeles de filtro, etc. usados para la extracción se lavan cada uno con una pequeña cantidad de éter etílico, y los productos del lavado se agregan al frasco de destilación. Se elimina el éter etílico por destilación en el frasco de destilación, se enfría cuando el volumen ha llegado a ser de unos 50 ml y se transfiere el extracto concentrado de éter etílico a un frasco de 100 ml de fondo circular cuidadosamente pesado junto con el lavado del frasco de destilación con una pequeña cantidad de éter etílico.

Se destila casi por completo el éter etílico del frasco de fondo circular, se agregan 3 ml de acetona, la mayor parte de los cuales se destila análogamente al proceso anterior, se calienta el extracto hasta 70 a 80°C durante 30 minutos a una presión ligeramente reducida (nos 200 mmHg), se coloca el frasco de fondo circular en un desecador al vacío y de deja reposar durante 30 minutos hasta que enfríe. Se pesa cuidadosamente el frasco de fondo circular para calcular el peso del extracto.

Se añaden y se mezclan por agitación 2 ml de éter etílico y 10 ml de etanol neutro en el frasco de fondo circular para disolver el extracto y se determina la cantidad de ácidos grasos contaminados por filtración con la disolución normalizada de hidróxido potásico N/10 etanolico usando el indicador de fenolftaleína, cuando el punto final es el color rojo pálido del indicador mantenido sin variación durante 30 segundos.

Contenido (%) de materias insaponificables:

$$= \{A - (B \times F \times 0,0282)\} / C \times 100$$

Ácidos grasos contaminados (sobre la base de ácido oleico, g):

$$= B \times F \times 0,0282$$

donde

A = peso del extracto (g)

B = cantidad de disolución normalizada de hidróxido potásico N/10 etanolico utilizada (ml)

C = cantidad de la muestra (g)

F = título de la disolución normalizada de hidróxido potásico N/10 etanolico.

Cuantificación del ácido arachidónico

Se utilizaron las preparaciones de aceite refinado obtenidas en el ejemplo inventivo 1 y en el ejemplo comparativo 1 para la preparación de ésteres metílicos de ácidos grasos según el método descrito a continuación, y los ésteres se sometieron a una cromatografía de gases para la determinación del contenido de ácido arachidónico. Los resultados se exponen en la Tabla 1.

TABLA 1

	Contenido de materias insaponificables (%)	Metales pesados	Contenido de 24, 25-metilenocolest-5-en 3 -ol (%)	Contenido de ácido arachidónico (%)
Ejemplo Invencido 1	0,5	No detectado	0,26	38
Ejemplo Comparativo 1	1	No detectado	0,51	39
Limite de detección				

ES 2 300 115 T3

Preparación de ésteres metílicos

Se pesaron con exactitud 15 mg de la muestra y se convirtieron en ésteres metílicos por tratamiento con Ácido metanol-hidroclórico (95:5) a 50°C durante 3 horas. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos resultantes se extrajeron completamente con exano, y se sometieron a una cromatografía de gases en las siguientes condiciones:

Columna

Fase líquida: Avance -DS 55%

Soporte: Chromosorb W (AW-DMCS)

Tamaño o: 80 a 100 paso de tamiz

Tamaño: diámetro interno 3 mm x 2,1 mL/m

Gas portador: nitrógeno 60 m

Detector: FID

Temperatura de la columna: 190°C

Temperatura del detector: 250°C

Temperatura del puerto de inyección: 240°C.

Cuantificación del 24,25-metilecolest-5-en-3 β -ol

Las preparaciones de aceite refinado obtenidas en el ejemplo inventivo 1 y el ejemplo comparativo 1 se sometieron a una cuantificación de 24,25-metilecolest-5-en-3 β -ol. Los resultados se exponen en la tabla 1.

Primero se explica el proceso para el análisis de la composición con esteroles. Se pesan de 30 a 80 mg del aceite de partida en un tubo de ensayo cerrado con un tapón, se añaden 4 ml de metanol y 1 ml de una disolución acuosa al 33% de hidróxido potásico, y se cierra el tubo con el tapón. Se deja reaccionar la mezcla con una suave agitación a 80°C durante 1 hora, se deja enfriar y se extraen los componentes solubles en las grasas con exano. Se lava la disolución de exano resultante con agua hasta que la capa acuosa ya no muestre una coloración con el indicador de fenolftaleína, y se concentra la disolución a presión reducida para dar una muestra para el análisis. Se disuelve la muestra en una pequeña cantidad de exano, y se somete la disolución a una cromatografía de gases en las condiciones descritas a continuación. Se usa el colesterol disponible comercialmente como norma interna, y se calcula la relación del peso con el del aceite de partida en base a la suposición de que la relación de la zona detectada de FID y el peso detectado es la misma para todos los esteroides. La relación calculada se define como el contenido de 24,25-metilenocolest-5-en-3 β -ol.

Condiciones de la cromatografía de gases:

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

Temperatura de la columna: 280°C

Temperatura de del puerto y detector de inyección: 300°C

Gas portador y presión de medida: helio, 1,2 kg/cm²

Gas preparación y velocidad: nitrógeno, 70 ml/min

Detector: FID

Relación de partición: 20.

Ejemplo inventivo 2

Se cultivaron por separado *Mortierella alpina* CBS527.72, *Mortierella alpina* ATCC42430, *Mortierella hygrophila* IFO5941 y *Mortierella elongata* IFO8570 como microorganismos productores de ácido arachidónico. Se colocaron 600 litros de un medio de cultivo que contenía un 4% de glucosa, 1% de extracto de levadura y un 0,2% de aceite de haba de soja en un recipiente 1000 l y se realizó un cultivo con aireación y agitación durante 7 días a 28°C con aireación a 11,0 vvm, velocidad de agitación a 100 rpm y presión interna del recipiente de 0,5 kg/cm²G. Los microbios secos se obtuvieron por filtración y secado.

ES 2 300 115 T3

Los microbios secos así obtenidos se trataron de la misma manera que se describió en el ejemplo inventivo 1 y el ejemplo comparativo 1. Se analizaron preparaciones del aceite refinado resultante en cuanto a su contenido de materias insaponificables, el contenido de 24,25-metilenocolest-5-en-3 β -ol y el contenido de ácido arachidónico.

5 Los resultados se presentan en la Tabla 2.

Se observó que el tratamiento en una columna puede producir una preparación de aceite refinado con un bajo contenido de 24,25-metilenocolest-5-en-3 β -ol, mientras se mantenía sin variación el contenido de ácido arachidónico.

10 TABLA 2

15	Cepa		Contenido de materias insaponificables (%)	Contenido 24, 25- methylene cholest-5-en-3 ol	Contenido de ácido arachidónico (%)
20	M.alpina CBS527.72	Ejemplo inventivo	0.6	0.22	33
25	M.alpina CBS527.72	Ejemplo comparativo	1.6	0.62	33
30	M.alpina ATCC42430	Ejemplo inventivo	0.3	0.11	26
35	M.alpina ATCC42430	Ejemplo comparativo	0.9	0.33	27
40	M.hygrophila IF05941	Ejemplo inventivo	0.5	0.15	23
45	M.hygrophila IF05941 1	Ejemplo comparativo	1.6	0.52	22
50	M.elongate IF08570	Ejemplo inventivo	0.4	0.23	21
55	M.elongata	Ejemplo comparativo	1	0.58	21

Ejemplo Inventivo 3

60 Se inoculó *Mortierella alpina* CBS754.68, como microorganismo productor de ácido arachidónico, en un recipiente de cultivo de 2000 l junto con 1400 l de un medio de cultivo que contenía 2% de glucosa, 1% de extracto de levadura y 1% de aceite de haba de soja; se inició el cultivo con aireación y agitación a 24°C con aireación de 0,5 vvm, velocidad de agitación 100 rpm, y presión interna del recipiente 1,0 kg/cm²G. La concentración de la glucosa se mantuvo a 1,5% por un sistema de realimentación, y los microbios se recogieron por filtración tras 9 días de cultivo,
65 para dar 20 kg de microbios secos. Se añadieron 15 litros de exano a 3 kg de microbios secos así obtenidos, y la mezcla se agitó suavemente durante 30 minutos. Después, el filtrado obtenido por filtración de aspiración se sometió a evaporación en un evaporador giratorio para eliminar el disolvente, dando 1800 g de un extracto de aceite crudo.

ES 2 300 115 T3

Se trataron 1000 gramos del extracto de aceite crudo en una columna como se describió en el Ejemplo Inventivo 1, para dar 900 g de aceite tratado en columna. 500 gramos del aceite tratado en columna y 800 g del extracto de aceite crudo se sometieron a destilación para eliminar las materias insaponificables.

5 El aceite tratado en columna, el aceite tratado por destilación y el aceite tratado en columna de destilación se desodorizaron por separado por destilación al vapor, y se agregó un 0,04% de tocoferol como agente antioxidante. Las preparaciones de aceite refinado resultantes se analizaron en cuanto a su contenido de materias insaponificables, el contenido de 24,25-metilenocolest-5-en-3 β -ol y el contenido de ácido arachidónico.

10 Los resultados se presentan en la Tabla 3.

Se demostró que el tratamiento en columna y/o la destilación pueden producir preparaciones de aceite refinado con un bajo contenido de 24,25-metilenocolest-5-en-3 β -ol, mientras se mantenía inmodificado el contenido de ácido arachidónico.

TABLA 3

Tratamiento	Contenido de materias insaponificables (%)	Contenido de 24,25-methylenechole st-5-en 3 -ol (%)	Contenido de ácido arachidonic (%)
Tratamiento en columna para desodorización	0.38	0.14	42
Destilación para desodorización	0.4	0.15	41 1
Tratamiento en columna y destilación para desodorización	0.36	0.13	43

Ejemplo Inventivo 4

Se realizó un cultivo de la misma manera que el descrito en el ejemplo 1 y el Ejemplo Comparativo 1 excepto que se usó una proteína de haba de soja al 1% (Nombre comercial: Esusan Meat, Ajinomoto Co., Inc.) en vez del extracto de levadura. Se analizaron las preparaciones obtenidas en cuanto a su contenido de materias insaponificables, su contenido de 24,25-metilenocolest-5-en-3 β -ol y el contenido de ácido arachidónico después del mismo tratamiento descrito en el Ejemplo Inventivo 1 y el Ejemplo Comparativo 1. Los resultados se presentan en la Tabla 4.

TABLA 4

	Contenido de materias insaponificables	Contenido 24,25-methylenechole st-5-en 3 -ol	Contenido de ácido arachidónico
Ejemplo Inventivo 4	0.5%	0.09%	37%

ES 2 300 115 T3

Ejemplo comparativo 4	1.1%	0.20%	37%
-----------------------	------	-------	-----

5 Ejemplo Inventivo 5

Se inoculó *Mortierella alpina* ATCC 32221 como microorganismo productor de ácido arachidónico en un recipiente de cultivo de 50 l junto con 25 l de un medio de cultivo que contiene un 4% de glucosa, un 1,2% de harina de haba de soja libre de grasas, 0,2% de fosfato de hidrógeno potásico y un 0,1% de aceite de haba de soja, y se realizó un cultivo con aireación y agitación durante 5 días a 28°C con aireación a 1,0 rpm, siendo la presión interna del recipiente de 10 kg/cm²G. Los microbios que contenían ácido arachidónico se recogieron por filtración y secado. Los microbios así obtenidos se trataron de la misma manera que se describió en el Ejemplo Inventivo 1 y el Ejemplo Comparativo 1, y las preparaciones del aceite resultante se analizaron respecto a su contenido de materias insaponificables, el contenido de 24,25-metileocolest-5-en-3 β -ol, y el contenido de ácido arachidónico. Los resultados se exponen la Tabla 5.

TABLA 5

	Contenido de materias insaponificables	Contenido 24, 25-methylenechole st-5-en-3 -ol	Contenido de ácido arachidónico
Ejemplo inventivo 5	0.5 %	0.02 %	25%
Ejemplo comparativo 5	0.9%	0.05%	25%

REIVINDICACIONES

1. Aceite comestible que contiene ácido arachidónico originado en microorganismos, **caracterizado** por contener
5 no más del 0,8% en peso de materias insaponificables y un 20% en peso o más de ácido arachidónico.

2. Aceite comestible que contiene ácido arachidónico originado en microorganismos, según la reivindicación 1,
caracterizado porque el contenido de materias insaponificables es no superior al 0,6% en peso.

10 3. Aceite comestible que contiene ácido arachidónico originado en microorganismos, según la reivindicación 1 o
la reivindicación 2, **caracterizado** porque el contenido de 24,25-metilenocolest-5-en-3 β -ol es no superior a 0,3% en
peso.

15 4. Aceite comestible que contiene ácido arachidónico originado en microorganismos, según la reivindicación 3,
caracterizado porque el contenido de 24,25-metilenocolest-5-en-3 β -ol es no superior al 0,15% en peso.

20 5. Aceite comestible que contiene ácido arachidónico originado en microorganismos, según una de las reivindica-
ciones 1 a 4, **caracterizado** porque los microorganismos son microorganismos pertenecientes al subgénero *Mortierella*
del género *Mortierella* y son capaces de producir ácido arachidónico.

6. Aceite comestible que contiene ácido arachidónico originado en microorganismos, según la reivindicación 5,
caracterizado porque los microorganismos pertenecientes al subgénero *Mortierella* son los pertenecientes a la especie
alpina del subgénero *Mortierella*.

25 7. Producto alimenticio que comprende un aceite comestible que contiene ácido arachidónico, **caracterizado** por-
que el contenido de 24,25-metilenocolest-5-en-3 β -ol es no superior al 0,8% en peso, y el contenido de ácido arachi-
dónico es del 20% en peso o más, respecto a la cantidad de aceite.

30 8. Fórmula para bebés prematuros, fórmula para bebés, alimentos infantiles y alimentos para mujeres embarazadas
y madres lactantes, que contiene un aceite comestible que comprende ácido arachidónico, **caracterizado** porque el
contenido de materias insaponificables es no superior al 0,3% en peso, el contenido de materias insaponificables es
no superior al 0,8% en peso, el contenido de ácido arachidónico es del 20% en peso o más, respecto a la cantidad de
microorganismos del aceite pertenecientes al subgénero *Mortierella* y a aquellos que pertenecen a las especies alpina
del subgénero *Mortierella*.

35 9. Uso del aceite comestible que contiene ácido arachidónico, según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracteri-
zado** por su empleo como ingrediente en alimentos y fórmulas.

40

45

50

55

60

65