(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 362 476**

(51) Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **06022844 .2**
(96) Fecha de presentación : **06.06.1997**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1785492**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **16.05.2007**

(54) Título: **Proceso para preparar ácido docosahexanoico y ácido docosapentanoico.**

(30) Prioridad: **23.07.1996 JP 8-193516**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.07.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.07.2011

(73) Titular/es: **NAGASE CHEMTEX CORPORATION**
1-17, Shin-Machi 1-chome
Nishi-ku, Osaka-shi, Osaka 550-8668, JP
NAGASE & COMPANY, Ltd. y
SUNTORY HOLDINGS LIMITED

(72) Inventor/es: **Fujikawa, Shigeaki;**
Shimizu, Sakayu;
Yaguchi, Toshiaki;
Tanaka, Satohiro y
Sogo, Tsutomu

(74) Agente: **Urízar Anasagasti, José Antonio**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

CAMPO TÉCNICO

La presente invención está relacionada con un proceso para la preparación de lípidos que contengan ácido docosahexanoico (más adelante, también referido como "DHA") y/o ácido docosapentanoico (más adelante, también referido como "DPA") mediante el cultivo de un microorganismo, así como un proceso para la preparación de DHA y/o DPA a partir de lípidos. La presente invención también está relacionada con un microorganismo que pertenece al género *Ulkenia* que tiene la capacidad de producir los lípidos.

ANTECEDENTE DE LA TÉCNICA

El DHA está contenido en el aceite del pescado que pertenece al grupo del pescado azul. Particularmente, el DHA está contenido en el aceite de sardinas o atún, en el cual DHA está contenido en una cantidad alrededor del 20 %.

Recientemente, debido al descubrimiento de material de pescado que contiene una alta concentración de DHA como grasa orbital de la tuna, o debido al progreso en la tecnología para la producción de ácidos grasos altamente purificados, esfuerzos intensivos han sido realizados para elucidar las funciones biológicas del DHA, y para investigar sus usos prácticos. Se ha convertido en evidencia que las funciones biológicas del DHA incluyen un efecto en el descenso del colesterol, un efecto anticoagulante y un efecto carcinostático. En relación al sistema metabólico del cerebro, se ha hecho evidente que el DHA es efectivo en mejorar la memoria y el aprendizaje, previniendo la demencia senil, y en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Además, se ha probado que el DHA es un ácido graso esencial para el crecimiento de los pececillos. Por las razones mencionadas arriba, el DHA es usado en varias comidas, materias primas de alimentos y en cebos para animales.

El DPA es también conocido por estar contenido en el aceite de pescado, aunque el contenido es extremadamente bajo. La mayoría de las funciones fisiológicas del DPA todavía no están conocidas. La única función conocida del DPA es su utilidad como portador en el transporte de agentes farmacéuticos hacia el cerebro [Publicación de patente Japonesa (Kokai) No. 61-2094136 (1986)]. Es esperado, sin embargo, que el DPA puede jugar un rol fisiológico en el cuerpo animal, ya que es conocido que el DPA se incrementa en compensación por una pérdida de DHA en el cuerpo animal [Homayoun *et al.*, J. Neurochem., 51:45 (1988); Hamm *et al*., Biochem. J., 245: 907 (1987); and Rebhung *et al*., Biosci. Biotech. Biochem., 58:314 (1994)].

Si uno intenta obtener DHA y/o DPA a partir de aceite de pescado, varias desventajas existen, por ejemplo, el bajo contenido de los ácidos grasos deseados, la incapacidad para mantener una fuente estable del aceite debido a la migración del pez, o al olor desagradable inherente en el aceite de pescado. Además, es difícil obtener lípidos con una calidad confiable, ya que el aceite de pescado contiene adicionalmente ácidos grasos insaturados como el ácido araquinoico (ARA) y el ácido eicosapentanoico (EPA), los que hacen a los lípidos susceptibles a la oxidación.

Además del aceite del pescado, los lípidos acumulados en células cultivadas de un microorganismo teniendo la habilidad para producir DHA y/o DPA son considerados como una fuente de DHA y/o DPA. Por ejemplo, los microorganismos siguientes son conocidos por producir DHA y DPA: *Vibrio marinus* ATCC 15381, una bacteria aislada de la profundidad del mar; la bacteria Vibrio aislada de los intestinos de un pez de la profundidad del mar; hongo flagelado como *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304, *Thraustochytrium* sp. ATCC 28211, ATCC 20890 y ATCC 20891, *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 y ATCC 20889 (Patente de los EE.UU. No. 5.340.742), cepa *Thraustochytrium* SR21 (Nippon Nogei Kagaku Kaishi, vol.69, extra edition. July 5, 1995), y *Japonochytrium* sp. ATCC 28207 [Publicación de Patente Japonesa (Kokai) No. 1-199588 (1989)]; microalga como *Cyclotella cryptica*, *Crypthecodinium cohnii* [Publicación de Patente Japonesa (Kohyo) No. 5-503425 (1993)], y *Emiliania* sp. [Publicación de Patente Japonesa (Kokai) No. 5-308978 (1993)].

En el uso de los microorganismos mencionados arriba, sin embargo, existen varios problemas, por ejemplo, un bajo rendimiento de DHA y/o DPA, un requerimiento de un período de cultivo prolongado para la obtención de una cantidad suficiente de DHA y/o DPA, o un requerimiento de un medio específico o una condición de cultivo para la producción. Cuando un alga como *Emiliania* sp. es utilizada para la producción, un alto rendimiento de DHA puede ser completado, aunque puede existir una desventaja en que los pasos de cultivo sean complicados debido al requerimiento de luz para el cultivo. Consecuentemente, tal proceso no es conveniente para la producción industrial.

Así, la presente invención descrita aquí hace posible la ventaja de proporcionar un proceso el cual puede producir DHA y/o DPA así como lípidos que contengan DHA y/o DPA usando un medio barato y convencional y pasos simples de producción, en un período corto y en un alto rendimiento.

La presente invención proporciona un proceso para la preparación de lípidos que contiene DHA y/o DPA que comprende el cultivo en un medio de un microorganismo perteneciendo al genero de *Ulkenia* teniendo la habilidad de producir DHA y/o DPA, y la recuperación de los lípidos del cultivo

La presente invención también proporciona un proceso para la preparación de DHA y/o DPA que comprende el cultivo en un medio de un microorganismo perteneciendo al genero Ulkenia teniendo la habilidad de producir DHA y/o DPA, y la recuperación de los lípidos del cultivo y la separación de DHA y/o DPA de los lípidos.

REVELACION DE LA INVENCION

Un proceso para la preparación de lípidos que contiene ácido docosahexanoico y ácido docosapentanoico según la presente invención que comprende: el cultivo en un medio de un microorganismo pertenciendo al genero de *Ulkenia* teniendo la capacidad de producir lípidos que contiene ácido docosahexanoico y/o ácido docosapentanoico, y la recuperación de dichos lípidos de un cultivo.

Un proceso para preparar acido docosahexaenoic según la presente invención incluyendo cultivos en un medio en un microorganismo perteneciendo al genero Ulkenia teniendo la habilidad de producir lípidos conteniendo acido docosahexaenoic y la recuperación de los lípidos del cultivo y la separación del acido docosahexaenoic de los lípidos

Un proceso para preparar acido docosapentaenoic según la presente invención conteniendo cultivaciones en um medio de microorganismo perteneciendo al genus Ulkenia teneidno la habilidad de producir lípidos conteniendo acido docosapentaenoic, y la recuperación de los lípidos del cultivo y la separación del acido docosahexaenoic de los lípidos.

La presente invención proporciona células de un microorganismo perteneciendo al genus Ulkenia conteniendo lípidos conteneniendo acido docosahexaenoic y acido docopentaenoic.

La presente imvencion proporciona un Ulkenia sp. torcdura SAM2179 teniendo la habilidad de producir lípidos conteniendo acido docosahexaenoic y acido docosapentenoic.

La presente invención proporciona un alimento suplementado con nutriente, una fórmula conveniente para la alimentación de infantes, una fórmula proporcionada para la alimentación de infantes inmaduros, una comida para bebé, un alimento para madres expectantes o con crías, un alimento geriátrico, un agente entérico para promover la nutrición, un alimento para animales, un aditivo para el alimento de animales, y un cebo para microorganismos para cebos que contengan los lípidos obtenidos por cualquiera de los procesos mencionados arriba.

Un proceso para la preparación de lípidos estructurales que contiene ácido docosahexanoico y ácido docosapentanoico de la presente invención que comprende el cultivo en un medio de un microorganismo perteneciendo al genero de *Ulkenia* teniendo la capacidad de producir lípidos que contiene ácido docosahexanoico y ácido docosapentanoico, la recuperación de dichos lípidos de un cultivo, y el tratamiento de dichos lípidos con lipasa fúngica para convertir los ácidos grasos en las posiciones 1 y 3 en la mitad de la cadena de ácidos grasos(C:8-12, ver. "SEIKAGAKUJITEN" (segunda edición) pp. 834, TOKYO KAGAKUDOJIN (1990)).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es un cromatograma líquido de triacilgliceroles en un lípido neutral obtenido en la presente invención.

MEJOR MÉTODO PARA LLEVAR A CABO LA INVENCIÓN

La presente invención está descrita adelante en más detalles. Como es usado aquí, el termino "ácido docosahexanoico" o "DHA" se refiere a series n-3 y/o series n-6 de ácido docosapentanoico. El término "grasas", "lípidos" y "aceite" son usados aquí con el mismo significado.

Cualquier microorganismo perteneciendo al genero de *Ulkenia* puede ser usado en el proceso de la presente invención, así también ellos tienen la capacidad de producir DHA y/o DPA. Por ejemplo cepas *Ulkenia* sp. SAM 2180 y SAM 2179 aislada de agua de mar por los inventores presentes puede ser usada. Entre estas cepas, las cepas SAM 2179 produce ambos DHA y DPA en un mejor grado. Esta cepa fue depositada con el Instituto Nacional de Biociencia y Tecnología Humana, la Agencia de Ciencia Industrial y Tecnología (dirección: 1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305, JAPAN), en Julio 23, 1996 y asignada un numero de acceso FERM BP-5601.

Las características micológicas de cepas *Ulkenia* sp. SAM 2179 y SAM 2180 son como sigue. Cuando estos microorganismos fueron cultivados en un medio liquido KMV (Fuller. M. and A. Jaworski eds.; Zoosporic Fungi in Teaching & Research VII + 303 pp., 1987. Southeastern Publishing Corporation, Athens) a 20 ºC en células oscuras, globosas u ovales fueron observadas, y zoosporas biflageladas fueron también observadas. Sin embargo, una conexión de filamentos ectoplásmicos no fueron observado. En conformidad, estos microorganismos fueron clasificados dentro de los hongos perteneciendo a *Thraustochytriales* con referencia a ""Iconos de Hongos Acuáticos Japoneses con Explicación Precisa" por Yosio Kobayasi y Kazuko Cono (publicado privadamente por los autores de su propio gasto, p.169, 1986). Además, estos microorganismos formaron rizoides, carecieron de apófisis, y formaron células tipo ameba en el medio liquido KMV. Por lo tanto, ellos fueron identificados como hongos pertenecientes al genero *Ulkenia* y las dos aisladas fueron designadas como Ulkenia sp. SAM 2179 y SAM 2180 , respectivamente.

El microorganismo perteneciente al género *Ulkenia* número de acceso FERM BP-5601 usado en el proceso de la presente invención no esta limitado a una cepa tipo salvaje, pero puede también incluir una cepa mutante o una recombinante. Entonces el uso de una cepa mutante o una recombinante designada para producir eficientemente DHA y/o DPA cae dentro del objeto de la presente invención. Dichas cepas mutantes o recombinantes incluyen microorganismos designados por contener un mayor por ciento de DHA y/o DPA en lípidos, o ambos, en comparación con el por ciento o la cantidad producida por la cepa original tipo salvaje, utilizando los mismos sustratos. La cepa tipo salvaje en concordancia con la presente invención contiene al menos 25% de DHA y/o 5% de DPA, preferiblemente 40-48% de DHA y/o 8-13% de DPA en los lípidos. Además, la cepa tipo salvaje de acuerdo a la presente invención contiene al menos 3 g de DHA y/o 0,5 g de DPA, preferiblemente 5 g de DHA y/o 1 g de DPA por litro de medio. Además, microorganismos designados para producir una cantidad comparable de DHA y/o DPA con la cepa tipo salvaje correspondiente, utilizando eficientemente sustratos con una ejecución de costo superior, también son contemplados.

Los microorganismos en concordancia con la presente invención son cultivados mediante la inoculación en un medio sólido o liquido con un pre-cultivo de los microorganismos. El medio puede o no puede contener agua de natural o artificial de mar.

Cualquiera de las fuentes de carbono usadas convencionalmente incluye, por ejemplo, pero no está limitado a, carbohidratos como glucosa, fructosa, xilosa, sacarosa, maltosa, almidón soluble, fucosa, glucosalina y dextrano, así como ácido oleico, grasas como leguminosas, ácido glutámico, molasas, glicerol, manitol, y el acetato de sodio puede ser usado como fuente de carbono al ser añadido al medio.

Fuentes naturales de nitrógeno como peptona, extracto de levadura, extracto de malta, extracto de carne, ácido casamino y licor de maíz escarpado, pastel de soja, fuentes de nitrógeno orgánico como glutamato de sodio y urea, y fuentes de nitrógeno inorgánico como acetato de amonio, sulfato de amonio, cloruro de amonio y nitrato de amonio pueden ser usados como fuente de nitrógeno.

Más allá, fosfatos como el fosfato de potasio, y el dihidrógeno fosfato de potasio, sales inorgánicas como el sulfato de amonio, sulfato de sodio, sulfato de magnesio, sulfato de hierro, sulfato de cobre, cloruro de magnesio y cloruro de calcio y vitaminas pueden ser añadidas como micronutrientes, si es requerido.

La cantidad de estos compuestos en el medio no está definido específicamente, mientras las concentraciones de los componentes no tengan un efecto nocivo en el crecimiento de los microorganismos. En general, las fuentes de carbono pueden ser añadidas a una concentración de 20 a 160 g por litro de medio, y fuentes de nitrógeno pueden ser añadidas a una concentración de 0,6 a 6 g por litro de medio. Preferiblemente, la cantidad de la fuente de nitrógeno es incrementada en correspondencia con el incremento en la cantidad de la fuente de carbono.

Después de la preparación del medio, el pH es ajustado a un rango entre 3,0 y 6,0 preferiblemente entre 3,5 y 5,0, más preferiblemente entre 3,5 y 4,5, usando un ácido o una base conveniente, y entonces el medio es esterilizado mediante autoclave o semejante. El cultivo de un microorganismo es usualmente llevado a cabo de 2 a 7 días, preferiblemente de 2 a 5 días, de 10 a 35 ºC, preferiblemente de 17 a 30 ºC, tanto con aireación-agitación, en zaranda, o en un cultivo estacionario.

Además, precursores de DHA y/o DPA pueden ser añadidos al medio para acelerar la producción de DHA y/o DPA. Por ejemplo, hidrocarbonos como el tetradecano, hexadecano, y el octadecano, ácidos grasos como el ácido oleico, y el ácido α-linolénico, o sales (e.g. sales de sodio y potasio) o ésteres de éstos son usados como precursores. Además, grasas que contienen estos ácidos grasos como un constituyente (e.g. aceite de oliva, aceite de soya, aceite de semilla de algodón o aceite de palma) pueden ser usados. Estos componentes pueden ser usados solos o en combinación con otro.

Fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, precursores o sus semejantes pueden ser añadidas al medio antes o durante el cultivo. La adición de estos componentes pueden ser llevado a cabo una vez, repetidamente o continuamente.

A fin de recuperar lípidos que contienen DHA y/o DPA en un rendimiento conveniente para el uso práctico, es preferible usar un medio líquido y cultivarlo con aireación-agitación. Un fermentador-agitación convencional o un fermentador de columna de burbuja pueden ser usados.

Mediante el cultivo como se describe arriba, lípidos que contienen DHA y/o DPA son producidos y acumulados en células. Cuando un medio líquido es usado, los lípidos los cuales contienen DHA y/o DPA pueden ser recuperados de un cultivo, o un cultivo esterilizado, durante el período de cultivo, a partir de un cultivo, o un cultivo esterilizado, al final del cultivo, o de células cultivadas o células secadas, colectadas de cualquiera de los cultivos mencionados arriba. Como es usado aquí, el término "cultivo" incluye células cultivadas que contienen células y sobrenadante de cultivo.

El DHA y/o DPA puede ser aislado de lípidos que contienen DHA y/o DPA recuperados de células cultivadas, como sigue. Después del cultivo, las células son colectadas a partir del cultivo mediante medios de separación sólido/líquido convencionales como centrifugación y filtración. Las células son lavadas extensivamente con agua; y preferiblemente ellas entonces son secadas. El secamiento de las células puede ser llevado a cabo mediante secamiento por congelación, secamiento por aire o algo semejante. Las células secadas son entonces destruidas, por ejemplo, por medios de dino-molimiento o ultrasonicación, y los lípidos son extraídos de las células con un solvente orgánico, preferiblemente bajo una corriente de nitrógeno. Un solvente orgánico como el éter, hexano, metanol, etanol, cloroformo, diclorometano o petróleo puede ser usado. La extracción alternativa con metanol y petróleo-éter o extracción con un sistema de solvente mezclado de cloroformo/metanol/agua puede ser usada también. Una alta concentración de lípidos que contienen DHA y/o DPA es obtenida mediante la evaporación del solvente orgánico del extracto bajo presión reducida.

Alternativamente, la extracción puede ser llevada a cabo con células húmedas. En este caso, un solvente compatible con agua como el metanol y el etanol, o un solvente mezclado compatible con agua consistiendo de alcohol (s) y agua y/o otros solventes pueden ser usados. Los otros procedimientos están como se describen arriba.

La cantidad de DHA en los lípidos obtenidos como se describe arriba es de la menos 3 g por litro de cultivo, preferiblemente 5 g por litro de cultivo. La cantidad de DPA en los lípidos es de al menos 0,7 g por litro de cultivo, preferiblemente 1,0 g por litro de cultivo.

En los lípidos obtenidos como se describe arriba, el DHA y/o DPA están presentes en forma de lípidos neutrales (e.g. triacilglicerol) o lípidos polares (e.g. fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina o fosfatidilinositol). La purificación de los triacilgliceroles que contienen DHA y/o DPA de lípidos que contienen DHA y/o DPA recuperados a partir de un cultivo es llevado a cabo mediante el uso de un método convencional como la separación por enfriamiento o la columna de cromatografía.

Típicamente, el contenido de lípidos neutrales en los lípidos de la presente invención es muy alto (más del 90% del total de lípidos). La composición representativa de los ácidos grasos en los lípidos neutrales es como sigue. Ácido palmítico: 30-38%; (n- 3) DHA: 40-48 %; (n- 6) DPA: 8-13 %; (n-3) EPA: 0-1 %; ARA: 0-0,6 %; otros ácidos grasos: 10-20 %.

Los lípidos neutrales de los lípidos de la presente invención contienen al menos 85% de triacilgliceroles, preferiblemente al menos 90% de triacilgliceroles. La cantidad de diacilgliceroles o monoacilgliceroles en los lípidos neutrales es muy baja. Esterol y/o éster esterol libres es contenido en una cantidad de 1-3%. Típicamente, las siguientes especies moleculares son encontradas en los triacilgliceroles: 16:0-16:0-22:5, 16:0-16:0-22:6, 16:0-22:5-22:6, 16:0-22:6-22:6, 22:5-22:6-22:6, y 22:6-22:6-22:6, en donde, por ejemplo, "16:0" significa un ácido graso que tiene "16" átomos de carbono y ningún ("0") doble enlace. Es interesante que los triacilgliceroles que consisten de solo ácidos grasos poli-insaturados existan en los lípidos de la presente invención.

La separación de DHA y/o DPA de lípidos que contienen DHA y/o DPA puede ser llevada a cabo mediante la hidrólisis de los lípidos, y entonces concentrándose y separándose de los ésteres de ácidos grasos mezclados resultantes preparados partir de ellos, mediante el uso de un método convencional como la adición de urea, la separación por enfriamiento o la columna de cromatografía.

El DHA y/o DPA así como los lípidos que contienen DHA y/o DPA obtenidos como se describe arriba pueden ser adicionados a varios alimentos, materias primas de alimentos o cebos para contrarrestar una deficiencia de DHA y/o DPA. Ejemplos de dichos alimentos incluyen, por ejemplo, alimentos suplementados con nutrientes, fórmula

conveniente para la alimentación de infantes o infantes inmaduros, alimentos saludables, alimentos funcionales (como un agente entérico para promover la nutrición), alimentos para bebés, alimentos para madres expectantes o con crías y alimentos geriátricos. Materias primas de alimentos incluye alimento para animales domésticos como puercos y vacas, alimento para aves de corral domésticas como pollos, alimentos domésticos para perros, gatos y semejante, y alimento para pescado, en crianza. Los cebos incluyen, por ejemplo, aquellos para microorganismos (llamados zooplancton) los cuales son dados como un cebo para el cultivo de pescado y marisco.

Particularmente, para las materias primas de alimentos y cebos, es ventajoso y económico el uso de un cultivo de un microorganismo de la presente invención, células colectadas a partir de un cultivo, o residuos de las células después de la recuperación de los lípidos. Por ejemplo, células de microorganismos las cuales producen DHA y/o DPA pueden ser directamente utilizadas para alimentar pececillos (el menor de los peces), en lugar de alimentar indirectamente a ellos a través de zooplancton y semejante. Estos materiales pueden ser usados también después del secamiento o esterilización, si es necesario.

Los lípidos de la presente invención pueden ser usados para producir huevos de aves de corral enriquecidos con DHA y/o DPA, los cuales son obtenidos mediante la alimentación de aves de corral para la colección de huevos (preferiblemente pollos) con alimento que contiene los lípidos de la presente invención. La yema de huevo enriquecida con DHA y/o DPA puede ser también producida mediante la extracción de aceite de dichos huevos de aves de corral o yema de huevo de aquellos usando un método convencional. Una fórmula conveniente para alimentación de infantes e infantes inmaduros, alimento de bebé, alimento para madres expectantes o con crías contenido dicho aceite de yema de huevo está también contemplado.

Esfuerzos han sido realizados por mucho tiempo para hacer la composición de leche en polvo para bebés similar a la leche humana. En particular, es importante hacer una composición de los ingredientes principales de la leche humana (i.e., proteína, grasa y azúcar) en la leche en polvo similar a la leche humana. Con relación a los lípidos, ha sido un problema que la leche en polvo tradicional es deficiente en ácidos grasos poli-insaturados, los cuales están inherentemente contenidos en la leche humana. Varios reportes sobre la composición de los ácidos grasos poli-insaturados en la leche humana han sido publicados (de ácidos grasos poli-insaturados en madres americanas, europeas, y africanas, ver INFORM, 6(8); 940-946 (1995); de ácidos grasos poli-insaturados en leche de madres japonesas, ver JJPEN, 13(9); 765-72 (1991)).

Recientemente, se ha demostrado que el ARA y DHA, ambos los cuales están incluidos en la leche humana, son efectivos en el crecimiento de los bebés ("Advances in Polyunsaturated Fatty Acid Research", Elsevier Science Publishers, pp.261-264 (1993). La importancia de ARA y DHA en el incremento de la altura y el desarrollo del cerebro fue también reportado (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:1073-1077 (1993); Lancet, 344:1319-1322 (1994)).

Por lo tanto, existe un interés incrementado en adicionar ARA y DHA a la leche modificada. La leche modificada que contiene aceite de pescado o una fuente para DHA están ahora en el mercado. El aceite de pescado contiene EPA, el cual está raramente presente n la leche humana, y la cual ha sido reportada por rendir un efecto adverso sobre el crecimiento de los infantes inmaduros ("Advances in Polyunsaturated Fatty Acid Research", Elsevier Science Publishers, pp.261-264 (1993). Los lípidos de la presente invención son convenientes como un aditivo para la leche modificada, ya que el contenido de EPA es extremadamente bajo. Los lípidos de la presente invención pueden ser adicionados también a alimento de bebé.

Los lípidos de la presente invención pueden ser adicionados al alimento, como un alimento suplementado con nutriente, alimento geriátrico, a alimento saludable, para el suministro de DHA y/o DPA o para el mantenimiento de la salud. La composición del alimento puede estar en la forma de alimentos sólidos o líquidos, o alimentos que contienen grasas. El contenido de lípidos en el alimento está preferiblemente entre 0,001 a 50% en peso, dependiendo de la naturaleza del alimento al cual los lípidos son adicionados.

Ejemplos de alimentos que contienen aceites incluyen alimentos naturales (como carne, pescado o nuez), alimento para el cual los lípidos son adicionados sobre la cocina (como en la sopa), alimento para el cual los lípidos son usados como medio de calentamiento (como en los bollitos de amasijo fritos), alimento de grasa (como la mantequilla), alimento procesado en los cuales los lípidos son rociados o aplicados sobre el complemento del procesamiento (como en las galletas duras). Los lípidos (o DHA y/o DPA separado) de la presente invención puede ser adicionado también a un alimento agrícola, alimento en fermentación, alimento de ganado, o bebida, la cual no contiene grasas.

Alternativamente, los lípidos de la presente invención pueden ser adicionados a un alimento funcional el cual exhibe la actividad fisiológica de DHA y/o DPA para la recuperación de una función disminuida del cuerpo o para la preservación bajo de ella. El alimento funcional de la presente invención puede estar en una forma de una formulación de medicamento o en una forma procesada (como un agente entérico para promover la nutrición, polvo,

gránulo, tablilla, solución interna, suspensión, emulsión, sirope y semejante) en la cual los lípidos de la presente invención están combinados con proteína, sacárido, microelementos, vitamina, agente emulsificante, o perfume.

Además, los lípidos de la presente invención pueden ser usados como un aditivo para un cosmético o para lavar, o un material de iniciación para la producción de un derivado de éstos para ser usados como un medicamento.

Más adelante, la presente invención será descrita específicamente mediante vías de ejemplos. Sin embargo, la invención no está limitada a los ejemplos.

(Ejemplo 1)

Producción de lípidos usando microorganismos perteneciente al género *Ulkenia* (1)

Las cepas de *Ulkenia* sp. SAM 2180 y SAM 2179 fueron cultivadas en un fermentador de volumen 5 litros (L) (jarra de fermentación) que contienen 3 L de medio teniendo la siguiente composición bajo las siguientes condiciones de cultivo.

(1) Composición del Medio

1) Glucosa (g/L):	60
2) Fosfato de Potasio (g/L):	3
3) Sulfato de Amonio (g/L):	2
4) Licor de Maíz escarpado (g/L):	0,7
5) 50% de agua de mar artificial (L):	1
6) pH:	4,0

(2) Condiciones de Cultivo

1)	Temperatura de cultivo (ºC):	28
2)	Cantidad de aireación (VVM):	0,5
3)	Proporción de agitación(rpm):	300
4)	Ajuste de pH:	Mantenida a pH 4 con 10% (peso/volumen) de hidróxido de sodio y ácido sulfúrico 1M.

Después del cultivo, las células fueron colectadas por centrifugación y secadas por congelación, entonces la cantidad (en peso) de células por litro de medio fue medida. La destrucción de las células y la extracción de los lípidos fueron llevadas a cabo mediante la adición de una mezcla de cloroformo/metanol (2:1, volumen/volumen) a las células secadas en un radio de 100 volúmenes por peso de células y homogenizando la mezcla en presencia de perlas de cristal. Después de lavar el extracto de acuerdo al método de Folch, el solvente fue evaporado para obtener los lípidos purificados, y el peso de los lípidos fue entonces medido.

A fin de estimar la composición de ácido graso o los lípidos purificados resultantes, ésteres de metil ácidos grasos fueron preparados mediante la disolución de una porción de los lípidos en una solución de mezcla de igual cantidad de solución metanol conteniendo HCl al 10% y diclorometano, y tratamiento con calor a la mezcla a 60ºC durante 2 horas. Los ésteres fueron entonces expuestos a cromatografía de gas para analizar la composición de ácido graso. Las condiciones de separación para la cromatografía gas líquido eran como sigue.

(3) Condiciones de separación

1) Columna: columna capilar TC-70 (GL Science Co. LTD,) diámetro interno 0,25 mm x 30 m de largo

2) Radio de flujo: 0,8 ml/min, 100kPa (presión del terminar de la columna)

3) Gas Portador: gas nitrógeno

4) Temperatura de la Columna: Modo creciente, 170-220ºC (4ºC/ min)

5) Detección: FID

Los resultados son mostrados en las Tablas 1 y 2 siguientes.

Tabla 1

Cepa	Tiempo de Cultivo (días)	Peso seco de la célula (g)*1	Cantidad total de lípidos (g)*1	Por ciento del contenido de lípidos (Peso%)*2	Cantidad de DHA (g)*1	Cantidad de DPA (g)*1
SAM2180	3	23,2	14,1	61	4,0	0,9
SAM2179	3	19,5	11,9	61	5,5	1,3

*1) Peso por litro de medio

*2) Por ciento versus células secadas

Tabla 2

Cepa	14:0	15:0	16:0	17:0	18:0	20:4 (AA)	20:5 (EPA)	22:5 (DPA)	22:6 (DHA)
SAM2180	2,7	2,4	55,0	1,0	1,4	-	0,2	6,7	28,7
SAM2179	2,4	0,9	37,2	0,3	0,6	0,4	0,6	10,6	

(Ejemplo 2)

Producción de lípidos usando microorganismo perteneciente al género *Ulkenia*

La cepa *Ulkenia* sp. SAM 2179 fue cultivada en un fermentador de volumen 5L (jarra de fermentación) conteniendo 3 L de medio teniendo la composición siguiente bajo las siguientes condiciones de cultivo.

(1) Composición del Medio

1)	Glucosa (g/L):	60
2)	Fosfato de Potasio (g/L):	3
3)	Sulfato de Amonio (g/L):	2
4)	Cloruro de Magnesio (g/L):	1,3
5)	Sulfato de Sodio (g/L):	1
6)	Cloruro de Calcio (g/L):	0,3
7)	Licor de Maíz escarpado (g/L):	0,7
8)	pH:	4,0

(2) Condiciones de Cultivo

1)	Temperatura de cultivo (ºC):	28
2)	Cantidad de aireación (VVM):	0,5
3)	Proporción de agitación(rpm):	300
4)	Ajuste de pH:	Mantenida a pH 4 con 10% (peso/volumen) de hidróxido de sodio y ácido sulfúrico 1M.

Después del cultivo, las células fueron colectadas por centrifugación y secadas por congelación, entonces la cantidad (en peso) de células por litro de medio fue medida. La destrucción de las células y la extracción de los lípidos fueron llevadas a cabo mediante la adición de una mezcla de cloroformo/metanol (2:1, volumen/volumen) a las células secadas en un radio de 100 volúmenes por peso de células y homogenizando la mezcla en presencia de perlas de cristal. Después de lavar el extracto de acuerdo al método de Folch, el solvente fue evaporado para obtener los lípidos purificados, y el peso de los lípidos fue entonces medido.

Con el propósito de estimar la composición de ácido graso de los lípidos purificados resultantes, ésteres de metil ácidos grasos fueron preparados mediante la disolución de una porción de los lípidos en una solución de mezcla de igual cantidad de solución metanol que contiene HCl al 10% y diclorometano, y tratamiento con calor a la mezcla a 60ºC durante 2 horas. Los ésteres fueron entonces expuestos a cromatografía de gas para analizar la composición de ácido graso. Las condiciones de separación para la cromatografía gas líquido fueron descritas en el Ejemplo1.

Los resultados son mostrados en las Tablas 3 y 4 siguientes.

Tabla 3

Cepa	Tiempo de Cultivo (días)	Peso seco de la célula (g)*1	Cantidad total de lípidos (g)*1	Por ciento del contenido de lípidos (Peso%)*2	Cantidad de DHA (g)*1	Cantidad de DPA (g)*1
SAM2179	3	21,5	12,0	56	5,5	1,5
*1) Peso por litro de medio *2) Por ciento versus células secadas						

Tabla 4

Cepa	14:0	15:0	16:0	17:0	18:0	20:4 (AA)	20:5 (EPA)	22:5 (DPA)	22:6 (DHA)
SAM2179	2,0	1,5	34,3	0,5	0,9	0,7	0,7	12,4	45,8

(Ejemplo 3)

Análisis de los lípidos de *Ulkenia* sp. SAM 2179

Los lípidos neutrales y los lípidos polares fueron separados de los lípidos en el Ejemplo 1 mediante la técnica de partición líquido-líquido convencional usando hexano y 90% de metanol. 0,92 g de lípidos neutrales y 0,05 g de lípidos polares fueron obtenidos a partir de 1 g de lípidos respectivamente. Los lípidos neutrales resultantes y los lípidos polares fueron analizados usando una cromatografía de capa fina. El desarrollo de color fue acompañado por

el uso de ácido sulfúrico, entonces la identidad de las mancha resultantes fueron confirmandas mediante la comparación de sus valores Rf con aquellos de los lípidos estándares.

Más del 90% de los lípidos neutrales eran triacilgliceroles. Los lípidos polares consisten de fofatidilcolina (60-80%), fosfatidiletanolamina (5.20%) y fosfatidilinositol (2-8%).

Los triacilgliceroles en los lípidos neutrales fueron analizados posteriormente mediante la separación de especies moleculares en cromatografía líquida (columna: columna ODS; fase móvil: acetona/acetonitrilo (3:2); detección: refractómetro diferencial (ver Figura 1). Los picos resultantes fueron aislados y, después de la hidrólisis, convertido a metilésteres. Los residuos de ácidos grasos fueron determinados mediante el uso de cromatografía gas líquido.

Los cinco picos principales fueron identificados como es mostrado en la Tabla 5. Los triacilgliceroles estaban compuestos de 12,8% de 1,2,3-tridocosahexaenoil-triacilglicerol y 8,0% de 1-docosapentaenoil-2,3-dl-docosahexaenoil-triacilglicerol. Cerca del 20% del total de triacilgliceroles estaba compuesto de ácidos grasos poli-insaturados.

Tabla 5

Pico	Especies Moleculares	Radio (%)
1	22:6-22:6-22:6	12,6
2	22:5-22:6-22:6	8,0
3	16:0-22:6-22:6	16,3
4	16:0-22:5-22:6	8,1
5	16:0-16:0-22:6	10,8

(Ejemplo 4)

Determinación de los residuos de ácidos grasos que se unen al sitio en los triacilgliceroles.

El sitio de unión del residuo del ácido graso en los triacilgliceroles obtenido en el Ejemplo 3 fue analizado como sigue. Los triacilgliceroles obtenidos en el Ejemplo 3 (especies moleculares: 16:0-16:0-22:6) fueron secados, y tratados con lipasa específica (de *Rhizopus japonicus*) de la posición 1,3. El residuo de ácido graso fue identificado usando GC/MS después de que los 2-monoacilgliceroles resultantes fueran trimetilsililados. El tratamiento con lipasa fue realizado en 2 ml de buffer de acetato 50 mM (pH 5,5) con 1000 unidades de lipasa a 35ºC durante 30 minutos. Los productos de la reacción fueron extraídos con éter y trimetilsililado usando agente trimetilsililante disponible comercialmente.

Un fragmento de pico correspondiente al peso molecular de los monoacilgliceroles al cual el 22:6 es unido fue observado, indicando que los triacilgliceroles son 16:0-22:6-16:0 a los cuales los residuos del ácido graso de 22:6 son unidos en la posición 2 en la del glicerol.

(Ejemplo 5)

Preparación de leche modificada conteniendo DHA y DPA

Leche modificada conteniendo DHA y DPA fue preparada mediante la adición de 0,44 g de lípidos en el Ejemplo 1, el cual contiene 46,2% de DHA y 10,6% de DPA, a 100 g de leche en polvo.

La composición de DHA y DPA en la leche resultante fue de 0,80% y 0,19% del total de ácidos grasos, respectivamente, el cual fue similar en esto a la leche humana.

(Ejemplo 6)

Preparación de los lípidos estructurales conteniendo DHA y DPA

50 ml de solución lipasa (5.600 U/ml, lipasa específica para la posición 1,3 de *Rhizopus delemar*) fue mezclada con 2,5 g de $CaCO_3$ como un portador inmovilizante. La enzima fue inmovilizada y precipitada mediante la adición de 40 ml de acetona a la mezcla, y la enzima inmovilizada fue entonces secada. La actividad específica de la enzima inmovilizada resultante fue de 9,3 U/mg. 120 g de la enzima inmovilizada fue mezclada con 1 g de DHA y DPA conteniendo lípidos obtenidos de SAM2180 en el Ejemplo 1, 2 g de ácido caprílico, y 60 mg de agua con agitación a 30ºC durante 8 horas. Los triacilgliceroles fueron entonces recuperados a partir una mezcla de reacción utilizando un método convencional y la composición de ácido graso de los triacilgliceroles fue determinada. Los resultados están mostrados en la Tabla 6.

Tabla 6

	8:0	14:0	15:0	16:0	17:0	18:0	20:4 (AA)	20:5 (EPA)	22:5 (DPA)	22:6 (DHA)
No tratamiento	0,0	2,7	2,4	55,0	1,0	1,4	0,0	0,2	6,7	28,7
Después del tratamiento con lipasa	36,2	1,8	1,2	17,6	1,0	1,8	0,0	0,2	7,3	30,4

Más del 30% de los triacilgliceroles tienen ácidos grasos poli-insaturados en la posición SN2 de los gliceroles. Entonces, estos lípidos son convenientes para la fabricación de un lípido estructural los cuales contienen ácidos grasos de cadena media de en la posición SN1 y SN3 de los gliceroles y ácidos graso poli-insaturados en la posición SN2 de los gliceroles.

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

Lípidos que contengan una alta cantidad de DHA y/o DPA y una baja cantidad de EPA pueden ser obtenidos mediante el proceso de la presente invención. El DHA y/o DPA puede ser también obtenido mediante la separación posterior de éstos a partir de los lípidos.

Los lípidos conteniendo DHA y/o DPA, el DHA separado y el DPA separado de la presente invención son útiles como aditivos para alimentos, forrajes, cebos, medicamento y semejante. Para forrajes o cebos, las células que contienen DHA y/o DPA de la presente invención pueden ser usadas. Huevo de ave o yema de huevo de ave enriquecido con DHA y/o DPA puede ser producido para la alimentación de aves de corral con forrajes en la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Proceso para la preparación de lípidos que contienen ácido docosahexanoico y/o ácido docosapentanoico que comprende:

el cultivo en un medio de un microorganismo de genero *Ulkenia* teniendo la habilidad de producir lípidos que contienen ácido docosahexanoico y/o ácido docosapentanoico, y la recuperación de dichos lípidos a partir del cultivo.

2. Proceso para la preparación de ácido docosahexanoico y/o ácido docosapentanoico que comprende:

el método de acuerdo con la Reivindicación 1, y además que comprende

la separación de dicho ácido docosahexanoico y/o ácido docosapentanoico a partir de dichos lípidos.