



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 101**

51 Int. Cl.:

C12P 7/64 (2006.01)

A23D 9/00 (2006.01)

A23C 11/04 (2006.01)

A61K 31/20 (2006.01)

A61K 8/92 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06077261 .3**

96 Fecha de presentación : **22.01.1992**

97 Número de publicación de la solicitud: **1801226**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.06.2007**

54 Título: **Ácido araquidónico y procedimiento de producción y uso del mismo.**

30 Prioridad: **24.01.1991 US 645454**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.10.2011

73 Titular/es: **MARTEK BIOSCIENCES CORPORATION**
6480 Dobbin Road
Columbia, Maryland 21045, US

72 Inventor/es: **Kyle, David J.**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 366 101 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

Ácido araquidónico y procedimientos de producción y uso del mismo.

La presente invención se refiere a una fórmula para criaturas que contiene ácido araquidónico.

El ácido araquidónico (ARA) es un ácido graso poliinsaturado (AGPI) de cadena larga de la clase omega-6 (ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico, es decir, 20:4). El ARA es el AGPI C₂₀ más abundante en el cuerpo humano. Es particularmente prevalente en órganos, músculo y tejidos sanguíneos, cumpliendo un papel principal como lípido estructural asociado predominantemente con fosfolípidos en sangre, hígado, músculo y otros sistemas orgánicos principales. Además de su papel principal como lípido estructural, el ARA es también el precursor directo de varios eicosanoides circulantes tales como prostaglandina E₂ (PGE₂), prostaciclina I₂ (PGI₂), tromboxano A₂ (TxA₂) y leucotrienos B₄ (LTB₄) y C₄ (LTC₄). Estos eicosanoides muestran efectos reguladores sobre el metabolismo de lipoproteínas, la reología sanguínea, el tono vascular, la función leucocitaria y la activación de plaquetas.

A pesar de su importancia para el metabolismo humano, el ARA no puede sintetizarse *de novo* en seres humanos. El ARA se sintetiza por elongación y desaturación de ácido linoleico (LOA), un ácido graso esencial. Este procedimiento requiere la presencia de la enzima Δ 6-desaturasa, una enzima presente en el cuerpo humano a bajos niveles, Burre y col., *Lipids*, 25: 354-356 (1990). Por consiguiente, la mayor parte del ARA debe suministrarse en la dieta y esto es especialmente importante durante momentos de crecimiento corporal muy rápido, tales como la infancia.

Durante su primer año de vida, un lactante puede duplicar o triplicar su peso. Por consiguiente, son necesarios niveles elevados de ARA en la dieta. Para satisfacer esta demanda aumentada, la leche materna humana contiene altos niveles de ARA. Sanders y col., *Am. J. Clin. Nutr.*, 31: 805-813 (1970). El ARA es el AGPI C₂₀ más prevalente en la leche materna. De las madres, especialmente las vegetarianas, que dan de mamar a sus criaturas, muchas se beneficiarían de ARA adicional en la dieta. Sin embargo, muchas madres no dan de mamar a sus criaturas, o no les dan de mamar durante todo el periodo de crecimiento rápido infantil, optando en su lugar por utilizar una fórmula para criaturas.

Ninguna fórmula para criaturas comercial conocida por el Solicitante contiene ARA. La Patente de Estados Unidos N° 4.670.285 (Clandinin y col.) desvela la necesidad del lactante de ácidos grasos incluyendo ARA. Para proporcionar estos ácidos grasos, Clandinin y col. sugieren una mezcla de yema de huevo, aceite de pescado o fosfolípidos de eritrocitos y aceites vegetales como el componente graso de una fórmula para criaturas propuesta. Sin embargo, el aceite de pescado contiene altas cantidades de ácido eicosapentaenoico (EPA). Se sabe que el EPA reduce la síntesis de ARA en criaturas. Carlson, y col., *INFORM*, 1: 306 (1990). Por lo tanto, sería deseable poder proporcionar ARA sin proporcionar también EPA adicional. Además, las yemas de huevo contienen una concentración relativamente baja de ARA, de modo que la mezcla de Clandinin y col. no es económicamente viable.

Debido a que el ARA está presente en aceites animales, pero no vegetales, su producción en cantidades comerciales ha continuado siendo un objetivo deseable pero difícil de conseguir. Shinmen, y col., *Microbiol. Biotech.* 31: 11-16 (1989), han descrito la producción de ARA por un hongo aislado, *Mortierella alpina*, usando una fermentación en tanque con agitación convencional. (Véase también la Patente Japonesa 1.215.245 para Shinmen y col.). Después del cultivo, los organismos se recogen, se secan y sus lípidos se extraen de la biomasa fúngica con un disolvente orgánico y los lípidos se modifican químicamente (covalentemente). Por ejemplo, la mezcla de lípidos se hidroliza o se convierte en ésteres etílicos y después se combina con ciclodextrina antes de su uso como un complemento dietético. Shinmen y col. no desvelan ni sugieren la administración de aceites microbianos no modificados.

Porphyridium cruentum, una microalga roja, puede cultivarse en estanques en grandes cantidades y tiene un contenido de lípidos que puede contener hasta el 40% de ARA. Ahern, y col. *Biotech. Bioeng.* 25: 1057-1070 (1983). Desgraciadamente, el ARA está principalmente asociado con galactolípidos, un lípido polar complejo no presente en la leche materna. Por lo tanto, el ARA utilizable total producido no sólo es una fracción del uno por ciento de la biomasa, sino que la forma del ARA no es adecuada para su uso como aditivo para una fórmula para criaturas sin modificaciones adicionales.

La Patente de Estados Unidos N° 4.870.011 (Suzuki y col.) desvela un procedimiento para obtener lípidos tales como ácido γ -linoleico a partir de hongos del género *Mortierella*. El ácido γ -linoleico se purifica a partir de la mezcla de lípidos contenidos en los hongos.

El documento DE 3603000A1 (Milupa) desvela una mezcla de grasa de ácidos altamente poliinsaturados y su uso como componente graso de una fórmula para criaturas. La mezcla de grasa tiene un alto contenido de ácidos ARA y docosahexanoico (DHA) en una proporción de 2,5:1, respectivamente, así como un alto contenido de colesterol. Se enumera que son fuentes de los ácidos grasos ciertos tipos de macroalgas, aceites de pescado, grasas orgánicas de vaca y cerdo o aceite de yema de huevo altamente refinado. Se dice que son una fuente del DHA y ARA macroalgas de los tipos faecofita y rodofita. No hay sugerencias del uso de ningún microbio como fuente de aceite. Los aceites de algas y pescado también incluyen típicamente EPA, que reduce la síntesis de ARA *in vivo*. Además, el aceite de yema de huevo altamente refinado no es una fuente económica de ARA. Además, no hay ninguna divulgación en el

mismo de un aditivo concentrado en ARA para complementar una fórmula para criaturas preexistente.

El documento JP 01-196255 describe el uso de ácidos grasos derivados de *Mortierella* en una fórmula para criaturas. En el Ejemplo 4, se lleva a cabo la fermentación de *M. elongata* para formar un lípido esterificado con etilo que incluye EPA y ARA en una proporción de 1:2.

- 5 Por consiguiente, continúa existiendo la necesidad de un procedimiento económico, comercialmente factible, de producción de ARA, preferentemente sin la producción concomitante de EPA. Un objeto de la presente invención es satisfacer esa necesidad.

Un objeto adicional de la invención es proporcionar una fórmula para criaturas de modo que los niveles de ARA en la fórmula se aproximen a los niveles en la leche materna humana.

10 **Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a una fórmula para criaturas que contiene un aceite fúngico (ARASCO) que contiene ácido araquidónico. Puede hacerse referencia al aceite como aceite de una sola célula. Se cultivan hongos en condiciones de producción de aceite, se recogen y el aceite se extrae y se recupera. El aceite, sin modificaciones químicas adicionales, puede usarse directamente para proporcionar ARA complementario. Las ventajas del aceite
15 usado en la invención incluyen su facilidad de producción y su alta pureza, y la ausencia de cantidades detectables de EPA.

En particular, la presente invención proporciona una fórmula para criaturas que comprende entre 50 y 1000 mg por litro de fórmula para criaturas de un aceite fúngico (ARASCO) que contiene ácido araquidónico (ARA), en la que

- 20 (i) está presente EPA en el aceite en menos de un quinto de la cantidad de ARA en el aceite,
(ii) el contenido de ARA en el aceite es del 10 al 50% de los ácidos grasos en el aceite;
(iii) el aceite es predominantemente un triglicérido y no está modificado; y
(iv) la proporción de ARA:EPA en la fórmula para criaturas es de al menos 5:1.

Descripción detallada de la realización preferida de la invención

- 25 La presente invención logra proporcionar una fuente económica de ácido araquidónico (ARA). En la fórmula para criaturas de la presente invención, el EPA está presente en menos de aproximadamente un quinto de la cantidad de ARA en el aceite. Este aceite, un aceite de una sola célula, se incluye en la fórmula para criaturas en una forma no modificada. Como se usa en el presente documento, el término "no modificado" significa que las propiedades químicas de los ácidos grasos, o los propios aceites, no se han alterado covalentemente. Por lo tanto, por ejemplo,
30 una modificación temporal en el ARASCO o ARA que pudiera revertirse después del consumo del aceite no estaría fuera del alcance de la presente invención.

Tabla 1. Composición de ácidos grasos de varias especies fúngicas.

Especie	Ácido graso								grasa total
	14:0	16:0	16:1	18:1	18:2	18:3	20:4	20:5	
<i>Mortierella alpina</i>	--	8,2	--	33,5	16,3	23,3	13,0	--	3,0
<i>Mortierella elongata</i>	2,0	13,2	--	26,6	11,9	13,2	13,8	2,4	4,0
<i>Mortierella isabellina</i>	0,3	15,7	0,8	55,8	11,1	9,0	--	--	7,3
<i>Saprolegnia parasitica</i>	7,4	19,1	1,9	6,3	24,5	12,5	10,5	10,5	9,3
<i>Pythium catenulatum</i>	6,5	9,9	10,3	21,2	18,5	3,5	13,4	10,9	5,0
<i>Pythium coloratum</i>	13,6	9,9	--	14,7	10,9	2,5	24,3	21,7	2,2
<i>Pythium gracile</i>	14,7	9,1	2,2	14,8	12,6	3,6	22,1	5,7	4,5
<i>Pythium irregulare</i>	10,3	15,4	6,9	12,3	21,0	3,9	10,6	12,4	11,9
<i>Pythium ultimum</i>	9,5	16,7	10,5	17,1	20,7	1,3	9,0	6,9	13,3
<i>Pythium insidiosum</i>	9,5	11,4	12,1	1,0	8,3	9,3	31,9	--	2,8

De aquellas especies fúngicas cuyos ácidos grasos se habían caracterizado previamente, se ha encontrado que la mayoría no generan ARA. Weete, J. D., Fungal Lipid Biochemistry, Plenum Press, N.Y. (1974). De aquellas especies que generan ARA, muchas, incluyendo todas las especies de *Pythium* previamente caracterizadas, producen

cantidades significativas de ácido eicosapentaenoico (EPA) además de ARA. La Tabla 1 expone el perfil de ácidos grasos de *P. insidiosum*, así como el perfil de ácidos grasos de otras especies de hongos. Inesperadamente, se ha descubierto que *P. insidiosum* produce ARA sin producción concomitante de EPA. Como con los aceites de pescado, altos niveles de EPA en complementos dietéticos dan como resultado una reducción de la capacidad para formar ARA a partir del ácido linoleico (LOA) de la dieta. Por consiguiente, aunque pueden utilizarse las especies fúngicas que producen tanto ARA como EPA en el procedimiento descrito en el presente documento, es preferible usar especies que no produzcan cantidades significativas de EPA. Dichas especies preferidas incluyen *Pythium insidiosum* y *Mortierella alpina*. Ambas especies están disponibles en el mercado y están en depósito en la Colección Americana de Cultivos Tipo en Rockville, Maryland, teniendo los números de acceso 28251 y 42430, respectivamente. Por toda la presente divulgación, a menos que se indique expresamente otra cosa, *P. insidiosum* será la especie fúngica representativa.

Uno de los problemas significativos que supera una realización de la presente invención es la reducción de la biosíntesis de ARA en criaturas causada por la presencia de niveles de EPA aumentados en la dieta. Este problema puede corregirse proporcionando ARA en una fórmula para criaturas a niveles sustancialmente similares a los encontrados en la leche materna humana. Típicamente, en la leche materna humana la proporción de ARA:EPA es de aproximadamente 20:1, respectivamente. La presente invención contempla específicamente el uso de cualquier aceite microbiano que proporcione una cantidad suficiente de ARA para superar los efectos negativos del EPA de la dieta. En particular, el aceite que contiene ARA proporcionará una proporción de ARA:EPA de al menos aproximadamente 5:1 en la fórmula para criaturas. Más preferentemente, la proporción será de al menos aproximadamente 10:1 y, más preferentemente, será de al menos aproximadamente 20:1. Como puede observarse, cuanto mayor es la cantidad de ARA en el producto final, con respecto a la cantidad de EPA, más deseable es el resultado.

En un procedimiento descrito en el presente documento, los hongos se cultivan en condiciones de cultivo de producción de aceite que contiene ARA adecuadas. En general, los expertos en la materia conocen bien técnicas de cultivo de hongos y esas técnicas pueden aplicarse al procedimiento que se describe en el presente documento. Por ejemplo, el cultivo de una cantidad de inoculación de hongos puede producirse en un cultivo sumergido en matraces con agitación. El matraz se proporciona con un medio de cultivo, se siembra con micelio fúngico y se cultiva en un agitador de vaivén durante aproximadamente tres a cuatro días.

La composición del medio de cultivo puede variar pero siempre contiene fuentes de carbono y nitrógeno. Una fuente de carbono preferida es la glucosa, cuyas cantidades pueden variar de aproximadamente 10-100 gramos de glucosa por litro de medio de cultivo. Típicamente, se utilizan aproximadamente 15 gramos/litro para cultivo en matraz con agitación. La cantidad puede variarse dependiendo de la densidad deseada del cultivo final. Otras fuentes de carbono que pueden usarse incluyen melazas, jarabe de maíz de alto contenido en fructosa, almidón hidrolizado o cualquier otra fuente de carbono convencional de bajo coste usada en procedimientos de fermentación. Además, puede proporcionarse lactosa como fuente de carbono para *P. insidiosum*. Por lo tanto, el permeado de suero, que tiene un alto contenido en lactosa y es una fuente de carbono de muy bajo coste, puede usarse como sustrato. Las cantidades adecuadas de estas fuentes de carbono pueden determinarse fácilmente por los expertos en la materia. Habitualmente, tiene que añadirse carbono adicional durante el transcurso del cultivo. Esto es porque los organismos usan tanto carbono que añadirlo todo de un modo discontinuo podría resultar difícil de manejar.

El nitrógeno se proporciona típicamente en forma de extracto de levadura a una concentración de aproximadamente 2 a aproximadamente 15 gramos de extracto por litro de medio de cultivo. Preferentemente, se proporcionan aproximadamente cuatro gramos por litro. Pueden usarse otras fuentes de nitrógeno, incluyendo peptona, triptona, agua de macerado de maíz, etc. La cantidad a añadir de estas fuentes puede determinarse fácilmente por los expertos en la materia. El nitrógeno puede añadirse de un modo discontinuo, es decir, todo de una vez antes del cultivo.

Después del cultivo durante 3-4 días a una temperatura adecuada, típicamente de aproximadamente 25-30°C, ha crecido una cantidad de hongos que es suficiente para usar como inóculo en un fermentador de tanque con agitación (STF) convencional. Dichos fermentadores son bien conocidos por los expertos en la materia y están disponibles en el mercado. La fermentación puede llevarse a cabo en modos de fermentación discontinuo, semicontinuo o continuo. Preferentemente, el STF está equipado con un impulsor de turbina tipo Rushton.

El fermentador se prepara añadiendo las fuentes de carbono y nitrógeno deseadas. Por ejemplo, un fermentador de 1,5 litros puede prepararse mezclando aproximadamente 50 gramos de glucosa y aproximadamente 15 gramos de extracto de levadura por litro de agua corriente. Como se ha analizado anteriormente, pueden usarse otras fuentes de carbono o nitrógeno o mezclas de las mismas.

El reactor que contiene la solución de nutrientes debería esterilizarse, por ejemplo, por calentamiento antes de la inoculación. Después de enfriarse hasta aproximadamente 30°C, el inóculo puede añadirse y el cultivo iniciarse. El intercambio de gases se proporciona por inyección de aire. La velocidad de inyección de aire puede variar, pero se ajusta preferentemente a de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 4,0 VVM (volumen de aire por volumen de fermentador por minuto). Preferentemente, el nivel de oxígeno disuelto se mantiene a de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 50% del valor de saturación de aire de la solución. Por consiguiente, pueden ser necesarios

ajustes en la velocidad de inyección durante el cultivo. Es deseable la agitación. La agitación se proporciona mediante el impulsor. La velocidad de la punta de agitación se ajusta preferentemente dentro del intervalo de aproximadamente 50 cm/s a aproximadamente 500 cm/s, preferentemente de aproximadamente 100 a 200 cm/s.

- 5 En general, la cantidad de inóculo puede variar. Típicamente, puede usarse de aproximadamente el 2% a aproximadamente el 10% en volumen de inóculo. Preferentemente, en un tren de siembra de fermentador puede usarse aproximadamente el 5% en volumen de inóculo.

- 10 Los niveles de nutrientes deberían controlarse. Cuando los niveles de glucosa caen por debajo de 5 g/l, debería añadirse glucosa adicional. Un ciclo de cultivo típico utiliza aproximadamente 100 gramos de glucosa y aproximadamente 15 gramos de extracto de levadura por litro. Es deseable reducir el nivel de nitrógeno durante el transcurso del cultivo ya que esto aumenta la producción de aceite por el hongo. Esto es especialmente cierto cuando se usa *M. alpina* como organismo de producción.

Ocasionalmente, el cultivo producirá una cantidad excesiva de espuma. Opcionalmente, puede añadirse un agente antiespumante, tal como los conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, Mazu 310®, para prevenir la formación de espuma.

- 15 La temperatura de cultivo puede variar. Sin embargo, los hongos que producen tanto ARA como EPA tienden a producir menos EPA y más ARA cuando se cultivan a mayores temperaturas. Por ejemplo, cuando *Mortierella alpina* se cultiva a menos de 18°C, comienza a producir EPA. Por lo tanto, es preferible mantener la temperatura a un nivel que induzca la producción preferente de ARA. Las temperaturas adecuadas son típicamente de aproximadamente 25°C a aproximadamente 30°C.

- 20 Preferentemente, el cultivo continúa hasta que se consigue una densidad de biomasa deseada. Una biomasa deseable es de aproximadamente 25 g/l del organismo. Dicha biomasa se alcanza típicamente en las 48-72 horas siguientes a la inoculación. En este momento, los organismos contienen típicamente aproximadamente el 5-40% de lípidos complejos, es decir aceite, de los que aproximadamente el 10-40% es ARA y puede recogerse.

- 25 La recogida puede realizarse por cualquier procedimiento adecuado tal como, por ejemplo, filtración, centrifugación o secado por pulverización. Debido a su menor coste, puede preferirse la filtración.

- 30 Después de la recogida, puede extraerse la torta micelial. La torta micelial se refiere al montón de biomasa resultante después de la recogida. La torta puede estar suelta o prensada, desmenuzada o no desmenuzada. Opcionalmente, puede eliminarse cualquier agua residual de la torta, como por secado al vacío o liofilización, antes de la extracción. Si se selecciona esta opción, es preferible usar disolventes no polares para extraer el aceite que contiene ARA. Aunque es adecuado cualquier extracto no polar, se prefiere hexano.

- 35 Como alternativa, la torta húmeda (que contiene típicamente aproximadamente el 30-50% de sólidos) puede desmenuzarse y extraerse directamente usando disolventes polares tales como etanol o alcohol isopropílico, o extracción con fluidos supercríticos con disolventes tales como CO₂ o NO. Preferentemente, las tortas se desmenuzan antes de la extracción. Ventajosamente, la presente invención permite el uso económico de técnicas de extracción con fluidos supercríticos. McHugh, y col., Supercritical Fluid Extraction, Butterworth (1986).

Dichas técnicas son conocidas para los expertos en la materia e incluyen las aplicadas en la actualidad, por ejemplo, para descafeinar granos de café. Aunque los rendimientos de las extracciones tanto en húmedo como en seco son similares, la extracción en húmedo es generalmente un procedimiento más económico.

- 40 Un procedimiento preferible de extracción acuosa implica mezclar la biomasa micelial con el disolvente polar alcohol isopropílico en una caldera de reacción adecuada. Se conocen dichas calderas. Se desea el uso de tres a seis partes de disolvente por parte de biomasa. Más preferentemente, la mezcla se realiza bajo nitrógeno o en presencia de antioxidantes para prevenir la oxidación del ARA en el extracto de lípidos. Como se usan en el presente documento, las expresiones "extracto de lípidos", "aceite", "complejo de lípidos" y "aceite fúngico" se usan indistintamente.

- 45 Después de la extracción, la mezcla puede filtrarse para eliminar la biomasa del disolvente que contiene el extracto de lípidos. En este punto, la biomasa puede recuperarse y usarse como complemento alimenticio. Como se usa en el presente documento, la expresión "complemento alimenticio" se refiere a un pienso o a un aditivo que se mezclará con un pienso típico, tal como grano, etc., que puede proporcionarse a animales.

- 50 El disolvente se separa del extracto de lípidos y también puede recuperarse para reutilizarse, como por evaporación en un colector adecuado, dejando lo que se denomina en el presente documento el "aceite bruto". El uso de alcohol isopropílico como disolvente da como resultado de forma deseable la eliminación de cualquier agua residual del aceite bruto, ya que la evaporación elimina el azeótropo de alcohol isopropílico/agua que se ha formado espontáneamente.

- 55 Aunque el aceite bruto puede usarse sin un tratamiento adicional, también puede purificarse adicionalmente. Pueden usarse procedimientos como los usados en la preparación de lecitina a partir de productos vegetales y conocidos por

los expertos en la materia, en esta etapa de purificación adicional. Dichos procedimientos no modifican químicamente ni covalentemente los lípidos que contienen ARA o el propio ARA.

Los rendimientos varían, pero típicamente son de aproximadamente 5 gramos de fosfolípidos que contienen ARA por 100 gramos de micelios secos. En el caso de *M. alpina*, pueden obtenerse 10-30 gramos de triglicéridos adicionales por 100 gramos de micelios secos. Puede usarse el aceite bruto o el producto refinado para su administración a seres humanos. Ambos se incluirán en la definición de ARASCO como se usa en el presente documento.

La presente invención proporciona fórmulas para criaturas humanas, en las que la concentración de ARA en dicha fórmula se aproxima mucho a la concentración de ARA en la leche materna humana. La Tabla 2 compara la composición de los ácidos grasos en el ARASCO con los de la leche materna y la fórmula para criaturas que carece de y que contiene ARASCO.

Tabla 2. Composición de ácidos grasos de productos de aceite fúngico y leche materna

Ácido graso	ARASCO	Fórmula para criaturas ¹	fórmula + aceite	leche materna ²
8:0	--	24,1	23,6	0,35
10:0	--	17,7	17,3	1,39
12:0	--	14,9	14,6	6,99
14:0	4,6	5,8	5,8	7,96
16:0	16,0	6,8	7,0	19,80
16:1	3,2	0,2	0,3	3,20
18:0	--	2,3	2,3	5,91
19:1	26,4	10,0	10,3	34,82
15:2n6	9,9	17,4	17,3	16,00
18:3n3	4,1	0,9	1,0	0,62
20:1	2,2	0,1	0,14	1,10
20:2n6	--	--	--	0,61
20:3n6	1,4	--	0,03	0,42
20:4n6	32,0	--	0,64	0,59
20:5n3	--	--	--	0,03
22:1	--	--	--	0,10
22:4n6	--	--	--	0,21
22:5n6	--	--	--	0,22
22:6n3	--	--	--	0,19

¹Simopculis, A., Omega-3 Fatty acids in Health and Disease, págs. 115-156 (1990)

Como puede observarse, la cantidad de ARA presente en la fórmula para criaturas complementada mediante ARASCO se aproxima mucho a los niveles de ARA en la leche materna humana. Además, la composición total de ácidos grasos de la fórmula para criaturas no se ha alterado significativamente mediante la adición del ARASCO. Se usan entre aproximadamente 50 y aproximadamente 1000 mg de ARASCO por litro de fórmula para criaturas. La cantidad específica de ARASCO necesaria depende del contenido de ARA. Éste varía de aproximadamente el 10 a aproximadamente el 50% de los ácidos grasos en el aceite. Sin embargo, típicamente el contenido de ARA es de aproximadamente el 30%. Cuando el contenido de ARA es de aproximadamente el 30%, un índice de complementación especialmente preferido es de aproximadamente 600 a 700 mg de ARASCO por litro de fórmula para criaturas. Dicho índice diluye los componentes grasos preexistente de una fórmula para criaturas tal como Similac® (Ross Laboratories, Columbus, Ohio) por sólo una parte de ARASCO respecto a cincuenta partes de aceites de la fórmula. Preferentemente, está presente EPA en el ARASCO en menos de un quinto de la cantidad de

ARA en el aceite.

Cuando se usa *Pythium insidiosum* en el procedimiento descrito, el aceite que contiene ARA extraído es predominantemente un fosfolípido. Cuando se usa *Mortierella alpina* en este procedimiento, el aceite que contiene ARA es predominantemente un triglicérido. Ambas formas de ARASCO son útiles como aditivos para una fórmula para criaturas. El primero no sólo proporciona ARA a la fórmula, sino también un emulsionante, es decir, fosfatidilcolina, que se añade comúnmente a fórmulas comerciales. Es probable que el aceite de *M. alpina* sea más económico de producir.

El ARASCO usado en la fórmula para criaturas de la presente invención es predominantemente un triglicérido.

Habiéndose descrito la invención en general, los siguientes ejemplos no limitantes específicos se exponen para ilustrar adicionalmente la invención.

Ejemplo 1. Preparación de lípidos de *P. insidiosum* y adición a una fórmula para criaturas

En un fermentador de 80 litros (volumen bruto), se combinaron 51 litros de agua corriente, 1,2 kg de glucosa, 240 gramos de extracto de levadura y 15 ml de antiespumante MAZU 210S®. El fermentador se esterilizó a 121°C durante 45 minutos. Se añadieron 5 litros adicionales de agua condensada durante el procedimiento de esterilización. El pH se ajustó a 6,2 y después se añadió aproximadamente 1 litro de inóculo (a una densidad celular de 5-10 g/l) de *Pythium insidiosum* (ATCC nº 28251). La velocidad de agitación se ajustó a 125 RPM (velocidad de punta de 250 cm/s) y la velocidad de aireación se ajustó a 1 SCFM (pie cúbico por minuto convencional). A la hora 24 en funcionamiento la velocidad de aireación se aumentó a 3 SCFM. A la hora 28 se añadieron 2 litros adicionales de jarabe de glucosa al 50% (1 kg de glucosa). A la hora 50 el fermentador se recogió, dando como resultado un rendimiento de aproximadamente 2,2 kg de peso en húmedo (aproximadamente 15 g de peso en seco) por litro. La biomasa recogida se exprimió hasta una torta de alto contenido en sólidos (sólidos al 50%) en un filtro de succión antes del secado por congelación. La biomasa seca se molió con un mortero y una mano de mortero y se extrajo con 1 litro de hexano por 200 gramos de biomasa seca a temperatura ambiente con agitación continua durante 2 horas. Después, la mezcla se filtró y el filtrado se evaporó para dar aproximadamente 5-6 gramos de aceite bruto por 100 gramos de biomasa seca. Después, la biomasa se volvió a extraer con 1 litro de etanol por 20 gramos de biomasa seca durante 1 hora a temperatura ambiente, se filtró y el disolvente se evaporó produciendo 22 gramos adicionales de aceite bruto por 100 gramos de biomasa seca. La segunda fracción eran predominantemente fosfolípidos, mientras que la primera fracción contenía una mezcla de fosfolípidos y triglicéridos. Las fracciones combinadas produjeron un aceite que contenía aproximadamente el 30-35% de ácido araquidónico y nada de EPA detectable. Este aceite se añadió gota a gota al producto de fórmula para criaturas comercial Simulac® (Ross Laboratories, Columbus, Ohio) a un índice de complementación de 600 mg por litro de medio preparado.

Ejemplo 2. Preparación de lípidos de *M. alpina* y adición a una fórmula para criaturas

Se cultivó *Mortierella alpina* (ATCC nº 42430) en un matraz con agitación de 2 litros que contenía 1 litro de agua corriente y 20 gramos medio de patata-dextrosa. El matraz estaba bajo agitación orbital constante y se mantuvo a 25°C durante siete días. Después de recogerse por centrifugación, la biomasa se secó por congelación produciendo aproximadamente 8 gramos de micelios ricos en lípidos. Los micelios se extrajeron usando hexano como en el ejemplo nº 1 y se obtuvieron como resultado aproximadamente 2,4 g de aceite bruto. Este aceite contiene aproximadamente el 23% de ácido araquidónico y se añadió a la fórmula comercial Similac® gota a gota en concentraciones de 1000 mg por litro.

REIVINDICACIONES

1. Fórmula para criaturas que comprende entre 50 y 1000 mg por litro de fórmula para criaturas de un aceite fúngico (ARASCO) que contiene ácido araquidónico (ARA), en la que
 - (i) EPA está presente en el aceite en menos de un quinto de la cantidad de ARA en el aceite,
 - (ii) el contenido de ARA en el aceite es del 10 al 50% de los ácidos grasos en el aceite,
 - (iii) el aceite es predominantemente un triglicérido y no está modificado; y
 - (iv) la proporción de ARA:EPA en la fórmula para criaturas es de al menos 5:1.
2. Fórmula para criaturas de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la proporción de ARA:EPA en la fórmula para criaturas es de al menos 10:1.
3. Fórmula para criaturas de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la proporción de ARA:EPA en la fórmula para criaturas es de al menos 20:1.
4. Fórmula para criaturas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el ARASCO está refinado.
5. Fórmula para criaturas de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que el ARASCO puede obtenerse por cultivo de hongos en condiciones de producción de aceite en un medio de cultivo, recolección de dichos hongos, extracción de dicho aceite de dichos hongos recolectados y recuperación del ARASCO.
6. Fórmula para criaturas de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el ARASCO se ha producido por *Mortierella alpina* y en la que la *Mortierella alpina* se cultiva a de 25°C a 30°C.
7. Fórmula para criaturas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6, en la que la recolección da como resultado una torta micelial, y en la que se ha eliminado cualquier agua residual de la torta antes de la extracción.
8. Fórmula para criaturas de acuerdo con la reivindicación 7, en la que se usa un disolvente no polar para extraer el ARASCO.
9. Fórmula para criaturas de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el disolvente no polar es hexano.
10. Fórmula para criaturas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en la que la recolección da como resultado una torta micelial, y en la que la torta está suelta o prensada, desmenuzada o no desmenuzada.
11. Fórmula para criaturas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, en la que el medio de cultivo contiene glucosa, melazas, jarabe de maíz de alto contenido en fructosa o almidón hidrolizado.
12. Fórmula para criaturas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, en la que el medio de cultivo contiene de 10 a 100 gramos de glucosa por litro de medio de cultivo.
13. Fórmula para criaturas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12, en la que se añade carbono durante el transcurso del cultivo.
14. Fórmula para criaturas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 13, en la que el medio de cultivo contiene peptona, triptona o agua de macerado de maíz.
15. Fórmula para criaturas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 14, en la que el medio de cultivo contiene extracto de levadura a una concentración de 2 a 15 gramos por litro de medio de cultivo.
16. Fórmula para criaturas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 15, en la que se reduce el nivel de nitrógeno durante el transcurso del cultivo.
17. Fórmula para criaturas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 16, en la que se proporciona agitación mediante un impulsor.