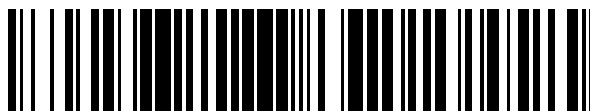


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 639**

51 Int. Cl.:
C12P 7/64

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03723218 .8**
96 Fecha de presentación: **25.04.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1498488**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.01.2005**

54 Título: **Procedimiento para la producción de un lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados**

30 Prioridad:
26.04.2002 JP 2002126757

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.03.2012

73 Titular/es:
Suntory Holdings Limited
1-40, Dojimahama 2-chome, Kita-ku
Osaka-shi, Osaka 530-8203, JP

72 Inventor/es:
Ono, Kazuhisa;
Aki, Tsunehiro y
Higashiyama, Kenichi

74 Agente/Representante:
Fúster Olaguibel, Gustavo Nicolás

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).

ES 2 377 639 T3

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la producción de un lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de un lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados, que comprende el cultivo de un microorganismo que pertenece al género *Mortierella* que produce un ácido graso altamente insaturado (en lo sucesivo denominado microorganismo *Mortierella*) con el uso de una fécula sacarificada que presenta un grado de sacarificación del 30-90% como fuente de carbono en el medio de cultivo, y la recolección de un lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados del cultivo. Una forma de realización adicional se refiere a un cultivo mixto de un microorganismo *Mortierella* y un microorganismo que pertenece al género *Aspergillus*.

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

En la presente solicitud, un ácido graso insaturado se refiere a un ácido graso que tiene uno o más dobles enlaces en una cadena carbonada y, entre éstos, el ácido graso que presenta un número de átomos de carbono de 18 o superior y dos o más dobles enlaces se denomina en general "ácido graso altamente insaturado". Ejemplos de ácidos grasos altamente insaturados incluyen el ácido γ -linolénico, ácido dihomo- γ -linolénico, ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico, ácido de Mead, ácido 6,9-octadecadienoico, ácido 8,11-eicosadienoico, etc. La mayoría de los ácidos grasos altamente insaturados generados por un microorganismo *Mortierella* se producen en forma de ácidos grasos que constan de triglicéridos y, aparte de éstos, también ácidos grasos que constan de diversos lípidos como diglicéridos, monoglicéridos, ácidos grasos libres, fosfolípidos, etc. Como se usa en el presente documento, el lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados es una mezcla de lípidos que contienen estos diferentes ácidos grasos altamente insaturados, y la cantidad de producción de ácido araquidónico es un valor obtenido convirtiendo la cantidad de ácido araquidónico existente en forma de ácidos grasos que constituyen esos diferentes lípidos en la cantidad de ácidos grasos libres. Además, se denomina "fécula sacarificada" a una mezcla de oligoglucosa y glucosa, que se obtiene tratando una fécula con una enzima sacarificante como la amilasa, se denomina "enzima sacarificante" a una enzima que degrada los azúcares como la amilasa que se usa para la producción de una fécula sacarificada, y el tratamiento de una fécula con la enzima se denomina "sacarificación". El grado de degradación de la fécula por sacarificación se denomina "grado de sacarificación", y el grado de sacarificación se expresa mediante la relación de azúcar reductor/azúcar total (%) de la fécula sacarificada. Por ejemplo, una relación de azúcar reductor/azúcar total del 50% indica que la longitud media de la cadena de α -glucano en la fécula sacarificada es de 2.

Ácidos grasos altamente insaturados como el ácido araquidónico, junto con el DHA (ácido docosahexaenoico), han atraído la atención desde un punto de vista nutricional, especialmente como componentes necesarios para el crecimiento de los bebés. Lanting y col. llevaron a cabo un estudio de seguimiento de bebés durante 9 años que habían sido amamantados y bebés que habían sido alimentados con una fórmula en polvo durante un periodo de tres semanas o superior después de su nacimiento. Examinaron la incidencia de una disfunción neurológica menor desde un punto de vista del comportamiento y, como resultado, informaron de que la incidencia de la disfunción neurológica en niños que habían sido alimentados con la fórmula en polvo era 2 veces superior a la de niños que habían sido amamantados (LANCET, vol. 344, 1319-1322 (1994)). Según el informe, el resultado es debido a que los ácidos grasos altamente insaturados como el DHA, ácido araquidónico, etc., que están presentes en la leche materna, pero apenas presentes en la fórmula en polvo, están involucrados en el desarrollo del cerebro del bebé. Además, con frecuencia se han presentado resultados en los que los ácidos grasos altamente insaturados están involucrados en el desarrollo del cerebro y la retina del neonato (Carlson y col., Broc. Natl. Acad. Sci. 90:1073-1077(1993)), y la importancia de esos ácidos grasos altamente insaturados está atrayendo la atención desde un punto de vista nutricional para bebés prematuros y neonatos.

Los ácidos grasos altamente insaturados están muy extendidos en los seres vivos y, por ejemplo, el ácido araquidónico se ha separado de un lípido extraído de glándulas adrenales o hígado animal. No obstante, puesto que el contenido de ácidos grasos altamente insaturados en los órganos animales es pequeño, la extracción y separación de ácidos grasos altamente insaturados a partir de un órgano animal no es un procedimiento suficiente para proporcionar una gran cantidad de ácidos grasos altamente insaturados. Por esta razón, se han desarrollado procedimientos de obtención de ácidos grasos altamente insaturados mediante el cultivo de diversos microorganismos. Entre los microorganismos, se sabe que el microorganismo *Mortierella* produce un lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados como el ácido araquidónico, el ácido dihomo- γ -linolénico, ácido eicosapentaenoico, etc., y se ha desarrollado un procedimiento para la producción de un lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados mediante fermentación usando este microorganismo (documentos JP-A N° 63-44891, JP-A N° 63-12290, JP-A N° 63-14696, JP-A N° 63-14697). Además, también se conoce un procedimiento para la producción de un ácido de Mead usando un mutante en el que las actividades de la enzima de desaturación $\Delta 12$ se encuentran reducidas o desaparecidas (documento JP-A N° 5-91887). Por otra parte, también se conoce un procedimiento para la producción de ácido dihomo- γ -linolénico usando un mutante en el que las actividades de la enzima de desaturación $\Delta 5$ se encuentran reducidas o desaparecidas, y que se obtiene sometiendo a un microorganismo *Mortierella* a inducción de mutaciones (documento JP-A N° 5-91887).

A pesar de que ya se sabe que el microorganismo *Mortierella* tiene la capacidad de asimilar fécula, puesto que su capacidad de asimilación de la fécula es inferior comparada con la capacidad de utilizar glucosa, la glucosa se ha utilizado ampliamente como fuente de carbono para dichos microorganismos (Shinmen y col., Appl. Microbiol. Biotechnol. 31:11-16 (1989), Aki y col., JAOCS 78:599-604 (2001)). Como resultado de prestar atención a la capacidad del microorganismo *Mortierella* para utilizar la fécula, se ha informado del aislamiento y la purificación de una enzima que degrada la fécula secretada, y la enzima que degrada la fécula se ha identificado como una α -glucosidasa (Tanaka y col., Bulletin of Japan Society of Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, Marzo 1999). Sin embargo, la α -

glucosidasa, que es una exo-amilasa con un patrón de degradación de escisión de unidades glucosa a partir de un extremo no reductor del α -glucano, presenta una baja actividad para degradar el α -glucano de alto peso molecular, uno de cuyos representantes es la fécula, y tiene una gran actividad de degradación de una oligoglucosa compuesta de varias glucosas. Se cree que ésta es una de las razones por las que la capacidad para utilizar fécula por parte de un microorganismo *Mortierella* es inferior que la capacidad para utilizar glucosa. Por otra parte, cuando se usa glucosa como fuente de carbono, puesto que el incremento en la presión osmótica debido a la elevada concentración de glucosa en el medio de cultivo tiene un efecto adverso sobre el crecimiento de las células, y sobre la productividad de un lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados de un microorganismo *Mortierella*, de manera generalizada se ha usado un procedimiento que comprende el cultivo del microorganismo con una baja concentración de glucosa y la adición secuencial de glucosa durante el cultivo para compensar la glucosa utilizada (Shinmen y col., Appl. Microbiol. Biotechnol. 31:11-16 (1989)). Además, también se ha llevado a cabo un intento para producir un lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados usando un microorganismo *Mortierella* que presenta resistencia a una elevada concentración de glucosa (Publicación internacional N° WO 98/39468). La fuente de carbono en el medio de cultivo supone la mayoría de los costes de las materias primas y, si éstas se pueden cambiar por una materia prima que sea más barata que la glucosa, se puede reducir el coste para la producción de un lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados. Cuando se usa una fécula, que es una materia prima para la glucosa, como fuente de carbono del medio, se puede reducir el coste de la materia prima. No obstante, la α -glucosidasa producida por el microorganismo *Mortierella* presenta una baja actividad de degradación de una fécula como se ha descrito anteriormente y, por tanto, la fécula no puede ser suficientemente asimilada por dicho microorganismo. Además, un medio de cultivo que contenga glucosa a una concentración elevada presenta una presión osmótica elevada, y esto se convierte en una causa del retraso del crecimiento del microorganismo *Mortierella*, una reducción en su productividad de un lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados y un cambio de la forma morfológica. Por tanto, es difícil producir un lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados a un bajo coste mediante un procedimiento de cultivo en discontinuo en el que la glucosa no se añade de manera secuencial durante el cultivo y está contenida a una concentración elevada en el momento de inicio del cultivo. Como medio para resolver este problema se utiliza un procedimiento de cultivo con alimentación en el que la glucosa se añade secuencialmente al medio de cultivo. No obstante, puesto que el cultivo con alimentación no sólo requiere un aparato adicional para añadir la glucosa de manera secuencial, sino que también incrementa el número de pasos y el tiempo de trabajo en la etapa de cultivo, este procedimiento incrementa los costes para la producción de un lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados. Además, a pesar de que la glucosa se produce mediante degradación enzimática de fécula con diversas amilasas, es necesario aislar y purificar la glucosa después del tratamiento enzimático. Así, los costes del tratamiento enzimático y el aislamiento y purificación hace que la glucosa sea más cara que la fécula.

Se ha informado de la producción de un lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados utilizando una fécula o una fécula soluble como fuente de carbono en el medio (Shinmen y col., Appl. Microbiol. Biotechnol. 31:11-16 (1989), Aki y col., JAOCs 78:599-604 (2001)). No obstante, el rendimiento de un lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados por azúcar en dicho medio de cultivo es inferior que aquel en el que se usa la misma cantidad de glucosa como fuente de carbono debido a la asimilación incompleta de una fécula o una fécula soluble.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La invención se expone en las reivindicaciones. La presente invención proporciona un procedimiento para la producción de un lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados, a un menor coste que los existentes, que comprende el uso de una fuente de carbono en el medio que es más barata que la glucosa, que no participa en el aumento de la presión osmótica del medio de cultivo y que puede ser asimilada por un microorganismo *Mortierella*.

La α -glucosidasa producida por un microorganismo *Mortierella* presenta una baja actividad de degradación de una fécula como se ha descrito anteriormente. Con el fin de utilizar una fécula como fuente de carbono en el medio, es necesario degradar la fécula a una fécula sacarificada que pueda ser degradada fácilmente por la α -glucosidasa producida por un microorganismo *Mortierella*. Sin embargo, cuando una fécula es completamente degradada en glucosa, se produce un incremento de la presión osmótica debido a un aumento de los monosacáridos, lo que tiene varios efectos negativos sobre la producción de un lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados como se ha descrito anteriormente. Así, los presentes inventores llegaron a la conclusión de que debían controlar la longitud media de la cadena de una oligoglucosa en una fécula sacarificada a una longitud adecuada que se pueda degradar fácilmente mediante la α -glucosidasa producida por un microorganismo *Mortierella*, con la selección de una enzima de degradación de azúcares para la sacarificación de la fécula y las condiciones de sacarificación con la enzima. Los presentes inventores compararon la productividad de un lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados que se habían extraído de células obtenidas cultivando un microorganismo *Mortierella* utilizando, como fuente de carbono en el medio, una fécula sacarificada preparada por sacarificación de una fécula usando varias enzimas de degradación de azúcares en diversas condiciones, con la productividad en el caso en el que el cultivo se lleva a cabo mediante un cultivo en discontinuo usando la misma cantidad de fécula o glucosa como fuente de carbono en el medio y con la productividad en el caso en el que el cultivo se lleva a cabo mediante un cultivo de alimentación añadiendo la misma cantidad de glucosa como fuente de carbono en el medio. Como resultado, los presentes inventores descubrieron que, cuando se usa una fécula sacarificada como fuente de carbono, se obtiene una mayor productividad comparada con el caso del cultivo en discontinuo usando una fécula o glucosa como fuente de carbono en el medio, y que la productividad era equivalente a la del cultivo de alimentación usando glucosa como fuente de carbono en el medio. Los presentes inventores realizaron estudios adicionales y finalmente completaron la presente invención.

Es decir, la presente invención se refiere a:

(1) Un procedimiento para la producción de un lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados, que comprende el cultivo de un microorganismo que pertenece al género *Mortierella* con el uso de un medio de cultivo que contiene una fécula sacarificada, y la recolección del lípido que contiene ácidos grasos altamente del cultivo,

en el que dicha fécula sacarificada tiene un grado de sacarificación del 30 al 90%.

(2) El procedimiento según (1), en el que la fécula sacarificada se obtiene tratando una fécula o una fécula soluble con una enzima sacarificante.

(3) Un procedimiento para la producción de un lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados, que comprende el cultivo de un microorganismo que pertenece al género *Mortierella* con el uso de un medio de cultivo que contiene (a) una fécula o una fécula soluble y (b) una enzima sacarificante, y la recolección de un lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados del cultivo,

en el que una fécula sacarificada producida a partir de dicha fécula o fécula soluble contenida en el medio de cultivo con dicha enzima sacarificante presenta un grado de sacarificación del 30 a 90% y se usa como fuente de carbono en el medio.

(4) Un procedimiento para la producción de un lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados, que comprende un cultivo mixto de un microorganismo *Mortierella* y un microorganismo que pertenece al género *Aspergillus* con el uso de un medio de cultivo que contiene una fécula o una fécula soluble, y la recolección de un lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados del cultivo,

en el que dicho microorganismo *Mortierella* se cultiva como microorganismo principal y dicho microorganismo que pertenece al género *Aspergillus* se cultiva como microorganismo auxiliar.

(5) El procedimiento según (4), en el que el microorganismo que pertenece al género *Aspergillus* es *Aspergillus oryzae* o *Aspergillus kawachii*.

(6) El procedimiento según una cualquiera de (1) a (5), en el que el microorganismo que pertenece al género *Mortierella* es un microorganismo que pertenece al subgénero *Mortierella*.

(7) El procedimiento según (6), en el que el microorganismo que pertenece al subgénero *Mortierella* es *Mortierella alpina* o *Mortierella alliacea*.

(8) El procedimiento según una cualquiera de (1) a (7), en el que el ácido graso altamente insaturado, es uno o más ácidos grasos seleccionados del grupo constituido por ácido γ -linolénico, ácido dihomo- γ -linolénico, ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico, ácido de Mead, ácido 6,9-octadecadienoico y ácido 8,11-eicosadienoico.

MEJOR MODO DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

El microorganismo utilizado en la presente invención puede ser cualquier microorganismo perteneciente al género *Mortierella* que puede producir un lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados. Como microorganismo, se pueden utilizar las cepas bacterianas descritas, por ejemplo, en MYCOTAXON, Vol. XLIV, N° 2, pp.257-265 (1992), y ejemplos específicos de los mismos incluyen los microorganismos que pertenecen al subgénero *Mortierella* tales como *Mortierella elongata* IFO8570, *Mortierella exigua* IFO8571, *Mortierella hygrophila* IFO5941, *Mortierella alpina* IFO8568, ATCC16266, ATCC32221, ATCC42430, CBS 219.35, CBS224.37, CBS250.53, CBS343.66, CBS527.72, CBS528.72, CBS529.72, CBS608.70, CBS754.68, etc. y los microorganismos que pertenecen al subgénero *Micromucor* como *Mortierella isabellina* CBS194.28, IFO6336, IFO7824, IFO7873, IFO7874, IFO8286, IFO8308, IFO7884, *Mortierella nana* IFO8190, *Mortierella ramanniana* IFO5426, IFO8186, CBS112.08, CBS212.72, IFO7825, IFO8184, IFO8185, IFO8287, *Mortierella vinacea* CBS236.82, etc.

Cualquiera de esas cepas se puede obtener en el Institute for Fermentation, Osaka City, y en la American Type Culture Collection (ATCC) en EE.UU., y en el Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) en los Países Bajos, sin restricción alguna. Por otra parte, se puede usar una cepa de *Mortierella elongata* SAM0219 (National Institute of Bioscience and Human-Technology, N° de depósito 8703) (National Institute of Bioscience and Human-Technology, N° de depósito condicional 1289) que se aisló de un suelo por los presentes inventores. Se puede utilizar tal como está cualquier cepa perteneciente a esos tipos de cultivos o cepas aisladas del mundo natural. Además, como microorganismo utilizado en la presente invención, se puede usar una cepa mutante o genéticamente recombinante de un microorganismo *Mortierella* (cepa silvestre). Entre ellos, ejemplos preferibles incluyen una cepa mutante y una cepa genéticamente modificada en las que, cuando se cultivan en condiciones de cultivo idénticas a las de una cepa silvestre, la cantidad de un ácido(s) graso(s) altamente insaturado(s) particular o de todos en un lípido es mayor, o la cantidad total de lípidos es mayor, en comparación con la de un lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados producidos por la cepa silvestre original, o las que pueden alcanzar ambos. Ejemplos de un mutante que contiene una mayor cantidad de un ácido graso altamente insaturado particular en un lípido incluyen *Mortierella alpina* SAM1861 que carece de la actividad de la enzima de desaturación $\Delta 12$ (National Institute of Bioscience and Human-Technology, N° de depósito condicional 3590, FERM BP-3590) y *Mortierella alpina* SAM1860 que carece de la actividad de la enzima de desaturación $\Delta 5$ (National Institute of Bioscience and Human-Technology, N° de depósito condicional 3589, FERMBP-3589). Por otra parte, se puede utilizar *Mortierella* SAM2197 que tiene resistencia a una alta concentración de glucosa (FERM BP-6261).

Ejemplos de un procedimiento para la producción de un lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados de la presente invención incluyen las tres formas de realización de (i) el cultivo del microorganismo *Mortierella* anteriormente mencionado con el uso de un medio de cultivo que contiene una fécula sacarificada, y la recolección de un lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados del cultivo, (ii) el cultivo del microorganismo *Mortierella* anteriormente mencionado con el uso de un medio de cultivo que contiene (a) una fécula o una fécula soluble y (b) una enzima sacarificante, y la recolección de un lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados del cultivo, o (iii) el cultivo mixto del microorganismo *Mortierella* anteriormente mencionado y un microorganismo productor de una enzima sacarificante (en lo sucesivo, denominado microorganismo productor de una enzima sacarificante) con el uso de un medio de cultivo que contiene una fécula o una fécula soluble, y la recolección de un lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados del cultivo. Cada forma de realización se explicará a continuación por separado.

Como primera forma de realización de la presente invención, se describirá un procedimiento para la producción

de un lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados, que comprende el cultivo del microorganismo *Mortierella* anteriormente mencionado con el uso de un medio de cultivo que contiene una fécula sacarificada, y la recolección de un lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados del cultivo, en el que dicha fécula sacarificada presenta un grado de sacarificación del 30 al 90%. Como se ha mencionado anteriormente, el uso de una fécula sacarificada que se obtiene mediante la sacarificación con antelación de una fécula como fuente de carbono en el medio de cultivo tiene la ventaja de que dicha fécula sacarificada se asimila fácilmente por parte de un microorganismo *Mortierella* y se evita un incremento de la presión osmótica en el medio de cultivo, por lo que se puede incrementar el rendimiento de un lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados por fuente de carbono.

El cultivo de un único microorganismo *Mortierella* en la presente forma de realización se puede llevar a cabo según el procedimiento convencional, excepto por el uso de una fécula sacarificada como fuente de carbono en el medio de cultivo. Por ejemplo, se puede poner como ejemplo un procedimiento en el que se inocula un medio de cultivo líquido o un medio de cultivo sólido con una espora o una hifa del microorganismo *Mortierella* o una disolución de cultivo obtenida por pre-cultivo, seguido por el cultivo.

Un medio de cultivo para el cultivo de un microorganismo en dicha forma de realización no está particularmente limitado siempre y cuando el medio de cultivo contenga una fécula sacarificada como fuente de carbono en el medio. Entre otros, es deseable que la fécula sacarificada usada como fuente de carbono en el medio presente un grado de sacarificación al cual pueda ser degradada muy fácilmente por α -glucosidasa producida por el microorganismo *Mortierella* que se debe cultivar, es decir, una longitud de cadena media de oligoglucosa en una fécula sacarificada. Especialmente, en vista del incremento en la presión osmótica y de la longitud de la cadena de oligoglucosa en la fécula sacarificada que puede ser asimilada por un microorganismo *Mortierella*, es preferible usar la fécula sacarificada cuya relación de azúcar reductor/azúcar total, es decir, el grado de sacarificación, es del 2 al 90% aproximadamente, preferentemente del 30 al 90% aproximadamente.

Una fécula sacarificada se puede obtener tratando una fécula o una fécula soluble con una enzima sacarificante y, seleccionando posteriormente la enzima sacarificante y ajustando las condiciones de sacarificación con la enzima, se puede obtener la fécula sacarificada con el grado de sacarificación deseado anterior. La enzima sacarificante no está particularmente limitada siempre y cuando sea una enzima de degradación de azúcares que pueda degradar la fécula, etc., pero es preferible una amilasa de tipo endo tal como una α -amilasa con patrones de degradación aleatorios, o una amilasa de tipo exo tal como una β -amilasa que escinde unidades maltosa de un extremo de la molécula de fécula. Alternativamente, se pueden usar enzimas sacarificantes que presenten mecanismos de acción diferentes al combinarlas. Se puede obtener una enzima sacarificante usada en sacarificación cultivando un microorganismo que produce la enzima sacarificante, y obteniendo la enzima del cultivo mediante un procedimiento conocido. Alternativamente, se puede usar una enzima sacarificante disponible comercialmente. Ejemplos de enzimas sacarificantes disponibles comercialmente incluyen una α -amilasa como la amilasa AD "Amano" 1 (fabricada por Amano Enzyme Inc.) y una pululanasa como Pululanasa "Amano" 3 (fabricada por Amano Enzyme Inc.). Además, la fécula sacarificada se puede obtener mediante otros procedimientos conocidos tales como degradación de féculas o féculas solubles con un ácido. Como ejemplo preferido de un procedimiento de degradación con ácidos para degradar una fécula o una fécula soluble con un ácido para obtener una fécula sacarificada existe un tratamiento usando ácido oxálico. Por otra parte, como fécula sacarificada, se puede usar una fécula sacarificada disponible comercialmente. Ejemplos de féculas sacarificadas disponibles comercialmente incluyen Fujisyrup C-75S, Fujisyrup C-75, HMT-75 y A-75 (todas ellas fabricadas por Kato Kagaku). Puesto que esas féculas sacarificadas disponibles comercialmente presentan grados de sacarificación diferentes, se puede seleccionar una fécula sacarificada que sea adecuada para llevar a cabo la presente invención.

El medio de cultivo usado en la presente forma de realización para el cultivo de un microorganismo puede incluir, como materia prima auxiliar para compensar la fécula sacarificada, una fuente de carbono habitual de un medio de cultivo, tal como glucosa, fructosa, xilosa, sacarosa, maltosa, molasas, glicerol, manitol, ácido cítrico, etc. Además, como fuente de nitrógeno del medio de cultivo, puede estar contenida en el medio de cultivo una fuente de nitrógeno orgánica tal como soja en polvo, copos de soja, soja en polvo desgrasada, proteína de soja comestible, péptido de soja, harina de soja, peptona, extracto de levaduras, extracto de malta, extracto de carne, ácido casamino, licor de maíz fermentado, urea, etc., o una fuente de nitrógeno inorgánica tal como nitrato de amonio, sulfato de amonio, etc., para el cultivo de un microorganismo usado en la presente forma de realización. Entre ellos, un ejemplo preferible de fuente de nitrógeno en el medio incluye soja desgrasada desnaturalizada térmicamente y, en particular, son más preferibles aquellas que hayan sido desnaturalizadas térmicamente de 70 a 90°C aproximadamente y de las que se haya extraído el componente soluble en etanol.

Por otra parte, un medio de cultivo para el cultivo de un microorganismo usado en la presente forma de realización puede contener, como fuente de micronutrientes, sales inorgánicas que comprenden ácido fosfórico, potasio, sodio, magnesio y/o calcio, y iones metálicos tales como hierro, cobre, cinc, manganeso, níquel, cobalto, etc. y vitaminas. Entre ellos, es preferible que contengan una o más sales inorgánicas seleccionadas del grupo constituido por ácido fosfórico, potasio, sodio, magnesio y calcio.

Además, con el fin de incrementar el rendimiento de los ácidos grasos altamente insaturados, un medio de cultivo para el cultivo de un organismo usado en la presente forma de realización puede contener, como precursor de los ácidos grasos altamente insaturados, por ejemplo, hidrocarburos como hexadecano y octadecano; ácidos grasos como ácido oleico y ácido linolénico o una de sus sales; triacilglicerol y ésteres de ácidos grasos como etiléster de un ácido graso, éster de un glicerol-ácido graso, éster de un sorbitán-ácido graso, etc.; grasas o aceites tales como aceite de oliva, aceite de soja, aceite de colza, aceite de semilla de algodón y aceite de palma. Sólo puede contener una clase de los compuestos anteriormente mencionados, o puede contener una combinación de dos o más de ellos.

La fuente de carbono, fuente de nitrógeno y otros componentes del medio anteriormente mencionados se pueden añadir a un medio de cultivo antes del inicio del cultivo y/o a un medio de cultivo durante el cultivo. Estos componentes del medio se pueden añadir de una vez, o se pueden añadir secuencialmente o separados en varias veces con un lapso de tiempo. Estos componentes del medio se pueden añadir solos o mezclándolos con antelación,

después de la esterilización. El procedimiento de esterilización, y el orden de adición no están particularmente limitados. Preferentemente, es deseable que la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno se esterilicen por separado, y es deseable que la sales se añadan antes de completar la fase de crecimiento logarítmica, más preferentemente antes de la fase intermedia del crecimiento logarítmico. Con respecto a otros componentes del medio que no tienen ninguna influencia sobre la concentración de iones del ácido fosfórico, iones de potasio, iones de sodio, iones de magnesio e iones de calcio, el tiempo de adición no está particularmente limitado siempre y cuando esos componentes tengan una concentración tal que no se vea inhibido el crecimiento del microorganismo *Mortierella*.

En la práctica, es deseable que la cantidad total de una fuente de carbono a añadir sea, en general, del 0,1 al 40% en peso aproximadamente, preferentemente del 1 al 25% en peso aproximadamente, y la cantidad total de una fuente de nitrógeno a añadir sea del 0,01 al 10% en peso aproximadamente, preferentemente del 0,1 al 10% en peso aproximadamente. Más preferentemente, durante el cultivo se puede añadir una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno, siendo la cantidad de fuente de carbono añadida inicialmente del 1 al 12% en peso y siendo la cantidad de fuente de nitrógeno añadida inicialmente del 0,1 al 8% en peso aproximadamente. Además, la cantidad del precursor de los ácidos grasos altamente insaturados anteriormente mencionado a añadir es del 0,001 al 10% aproximadamente, preferentemente del 0,5 al 10% aproximadamente en relación con el medio de cultivo.

Las condiciones de cultivo no están particularmente limitadas, y pueden ser aquellas de los procedimientos convencionales. Por ejemplo, la temperatura de cultivo es de 5 a 40°C aproximadamente, preferentemente de 20 a 30°C aproximadamente. Alternativamente, después de que el microorganismo *Mortierella* haya proliferado de 20 a 30°C aproximadamente, se puede proseguir con el cultivo de 5 a 20°C aproximadamente para producir un ácido graso altamente insaturado. El pH del medio de cultivo es de 4 a 10 aproximadamente, preferentemente de 5 a 8 aproximadamente. Ejemplos del método de cultivo incluyen un cultivo aireado con agitación, cultivo agitado, cultivo estático, etc. Normalmente el cultivo se lleva a cabo durante 2 a 20 días aproximadamente. Haciendo el cultivo como se ha mencionado anteriormente, se produce un lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados y se acumula en el microorganismo *Mortierella*. En la presente invención, es preferible un cultivo aireado con agitación usando un medio líquido.

A continuación, el lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados se recoge del cultivo así obtenido. Ejemplos de dicho "cultivo" incluyen una disolución de cultivo durante la producción de un lípido por cultivo y su producto esterilizado, o una disolución de cultivo después de completar el cultivo y su producto esterilizado, o células cultivadas recogidas de cada uno de ellos y sus productos secos. Como procedimiento de recolección de un lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados del cultivo anteriormente mencionado, se puede usar el procedimiento conocido. Por ejemplo, se puede recoger un lípido objetivo a partir de células cultivadas mediante el procedimiento siguiente.

Después de completar el cultivo, las células cultivadas se obtienen a partir de la disolución de cultivo mediante un procedimiento de separación convencional sólido-líquido tal como centrifugación y/o filtración. Preferentemente las células cultivadas se lavan con agua, se muelen y se secan. El secado se puede llevar a cabo mediante liofilización, secado al aire, etc. Las células secas preferentemente se tratan por extracción con un disolvente orgánico en una corriente de nitrógeno. Ejemplos de los disolventes orgánicos usados incluyen éter, hexano, metanol, etanol, cloroformo, diclorometano, éter de petróleo, etc. Alternativamente, también se puede obtener un mejor resultado mediante una extracción alternada con metanol y éter de petróleo, o una extracción usando un disolvente de una capa de cloroformo-metanol-agua. Entre ellos, es preferible realizar la extracción usando hexano. Con la destilación del disolvente orgánico del extracto a presión reducida se puede obtener un lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados en una concentración elevada. Alternativamente, la extracción se puede llevar a cabo usando células húmedas, en lugar del procedimiento anteriormente mencionado. En este caso, se usa un disolvente que sea compatible con el agua tal como metanol, etanol, etc., o un disolvente mixto compatible con agua que contenga los disolventes anteriormente mencionados y el agua y/u otros disolventes. Los otros procedimientos son los mismos que los descritos anteriormente.

Como segunda forma de realización de la presente invención, se describirá un procedimiento para la producción de un lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados que comprende el cultivo del microorganismo *Mortierella* anteriormente mencionado usando un medio de cultivo que contiene (a) una fécula o una fécula soluble y (b) una enzima sacarificante, y la recolección de un lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados del cultivo, en el que la fécula sacarificada producida a partir de dicha fécula o fécula soluble contenida en el medio de cultivo con dicha enzima sacarificante presenta un grado de sacarificación del 30 al 90% y se usa como fuente de carbono en el medio. En la presente forma de realización, como fuente de carbono en el medio se usa una fécula sacarificada producida a partir de una fécula o una fécula soluble contenida en el medio de cultivo con una enzima sacarificante. Es decir, en la presente forma de realización, la sacarificación de la fécula y el cultivo de un microorganismo *Mortierella* se llevan a cabo al mismo tiempo. Más específicamente, el proceso se produce de tal manera que se añade una enzima sacarificante a un medio de cultivo que contiene una fécula o una fécula soluble como fuente de carbono para convertir la fécula o la fécula soluble en una fécula sacarificada que se degrada fácilmente mediante la α -glucosidasa producida mediante un microorganismo *Mortierella*, y la glucosa producida a partir de la fécula sacarificada mediante la α -glucosidasa es asimilada por el microorganismo *Mortierella* para producir un lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados.

La fécula usada en la presente forma de realización no está particularmente limitada, pero ejemplos específicos de la misma incluyen fécula de arroz, fécula de caña, fécula de patata, fécula de tapioca, fécula de trigo y fécula de maíz, y la fécula procesada y su α -fécula. Entre las féculas, aquellas que son solubles en agua caliente se denominan féculas solubles.

Como enzima sacarificante usada en la presente forma de realización, se puede usar cualquier enzima sacarificante siempre y cuando sea una enzima usada para la sacarificación. Específicamente, como se ha mencionado en la primera forma de realización se puede usar una enzima sacarificante preparada a partir de un microorganismo que produce enzimas sacarificantes y una enzima sacarificante disponible comercialmente. Ejemplos de la enzima

sacarificante usada en la presente forma de realización incluyen, como en la primera forma de realización, una amilasa de tipo endo tal como α -amilasa con patrones de degradación aleatorios, y se prefiere una β -amilasa que escinde unidades maltosa de un extremo de una molécula de fécula, y también se puede usar una amilasa de tipo exo tal como glucoamilasa que degrada la fécula secuencialmente a partir de un extremo no reductor para producir glucosa. Esto se debe a que no se producen efectos adversos debidos a un incremento de la presión osmótica del medio de cultivo, puesto que la glucosa producida por la glucoamilasa es inmediatamente asimilada por el microorganismo *Mortierella*.

La presente forma de realización es completamente idéntica a la primera forma de realización excepto que se usa (a) una fécula o una fécula soluble y (b) una enzima sacarificante como componente del medio para el cultivo del microorganismo en lugar de la fécula sacarificada. El componente del medio para el cultivo del microorganismo en la presente forma de realización puede contener la fécula sacarificada anteriormente mencionada.

A continuación, como tercera forma de realización de la presente invención, se describirá un procedimiento para la producción de un lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados, que comprende el cultivo mixto del microorganismo *Mortierella* anteriormente mencionado y un microorganismo que pertenece al género *Aspergillus* con el uso de un medio de cultivo que contiene una fécula o una fécula soluble, y la recolección de un lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados a partir del cultivo, en el que dicho microorganismo *Mortierella* se cultiva como microorganismo principal y dicho microorganismo que pertenece al género *Aspergillus* se cultiva como microorganismo auxiliar. En la presente forma de realización, como fuente de carbono en el medio se usa una fécula sacarificada producida mediante una enzima sacarificante producida por un microorganismo que produce enzimas sacarificantes a partir de una fécula o una fécula soluble contenida en un medio de cultivo. Es decir, la presente forma de realización es un procedimiento en el que se produce una fécula sacarificada mediante el cultivo mixto de un microorganismo que produce enzimas sacarificantes usado en la sacarificación junto con un microorganismo *Mortierella* en un medio de cultivo que contiene una fécula o una fécula soluble como fuente de carbono en el medio, y el microorganismo *Mortierella* produce un lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados a partir de la fécula sacarificada.

En la presente forma de realización, el microorganismo *Mortierella* se cultiva como microorganismo principal, y el microorganismo que produce enzimas sacarificantes se cultiva como microorganismo secundario. Entre ellos, como microorganismo que produce enzimas sacarificantes, se usa un hongo que pertenece al género *Aspergillus* que produce α -amilasa y, en particular, son más preferibles *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus kawachii*. Además, preferentemente como microorganismo auxiliar se puede usar un microorganismo *Aspergillus* que segrega la glucoamilasa. Por otra parte, con el cultivo simple de un mutante o una cepa genéticamente recombinante de un microorganismo *Mortierella* al que se le confiere la capacidad de producir una enzima sacarificante se puede obtener el mismo efecto que con el cultivo mixto con un microorganismo que produce enzimas sacarificantes.

La presente forma de realización es completamente idéntica a la primera forma de realización, excepto por el uso de una fécula o una fécula soluble como componente del medio para el cultivo del microorganismo en lugar de la fécula sacarificada, y se mezcla un microorganismo *Mortierella* y un microorganismo que produce enzimas sacarificantes y se cultiva en lugar del cultivo simple de un microorganismo *Mortierella*. Además, el componente del medio para el cultivo del microorganismo en la presente forma de realización puede contener la fécula sacarificada anteriormente mencionada. En este caso, es preferible que el grado de sacarificación de la fécula sacarificada, es decir, la relación de azúcar reductor/azúcar total sea del 0 al 80% aproximadamente, preferentemente del 0 al 70% aproximadamente. Cuando un microorganismo *Mortierella* y un microorganismo que produce enzimas sacarificantes se ponen en un cultivo mixto, ambos microorganismos se pueden cultivar al mismo tiempo, o después de que uno de los microorganismos se haya cultivado hasta una cierta fase, se puede añadir el otro microorganismo para llevar a cabo el cultivo mixto.

El lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados obtenido mediante el procedimiento anterior se puede usar en diversas aplicaciones tales como piensos y alimentos. Es preferible que el lípido contenga uno o más ácidos grasos altamente insaturados seleccionados del grupo constituido por el ácido γ -linolénico, ácido dihomo- γ -linolénico, ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico, ácido de Mead, ácido 6,9-octadecadienoico y ácido 8,11-eicosadienoico. La separación y purificación de dicho ácido graso altamente insaturado se puede llevar a cabo mediante extracción en disolventes y, después de la desolvatación, por desacidificación, decoloración, desodorización, eliminación de gomas o separación en frío según los procedimientos convencionales. Los ejemplos preferidos incluyen el procedimiento descrito en la Publicación internacional WO 98/39468.

EJEMPLOS

La invención se describirá a continuación en detalle por medio de Ejemplos, pero huelga decir que la presente invención no está limitada por ellos. Los componentes de la composición en un medio de cultivo se presentan en todos los casos en % en peso.

Ejemplo 1

Como microorganismo productor de ácido araquidónico se usó *Mortierella* SAM2197 (FERM BP-6261).

Se prepararon 5 l de cada uno de los medios de cultivo 1-A, 1-B y 1-C mostrados en la Tabla 1 en un tanque de cultivo con una capacidad de 10 l, y se inocularon con la disolución pre-cultivada preparada con antelación mediante cultivo en un matraz, seguido del cultivo. La fécula tratada con amilasa para un medio de cultivo 1-A usada en este ejemplo era la fécula obtenida añadiendo α -amilasa (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd., código N° 011-16881) a una fécula e incubando a 37°C durante 30 minutos. El azúcar reductor se midió con el método de Somogyi-Nelson, y el azúcar total se midió con el método de fenol- H_2SO_4 . Como resultado de la medición, la relación de azúcar reductor/azúcar total de la fécula tratada con amilasa para el medio de cultivo 1-A fue del 38%, y la relación de azúcar reductor/azúcar total de la fécula soluble para el medio de cultivo 1-B fue del 0%.

Después de airear el cultivo con agitación durante 7 días, se obtuvo una cantidad de ácido araquidónico producido de 4,2 g/l en el medio de cultivo 1-A, 1,2 g/l en el medio de cultivo 1-B, y 4,3 g/l en el medio de cultivo 1-C. Se calculó la cantidad de ácido araquidónico producido de la manera siguiente. Se filtró la disolución de cultivo a través de papel de filtro para recuperar la pasta celular, y las células se secaron a 105°C y se pesaron. El valor del peso después de secar se dividió por el valor del volumen de la disolución de cultivo que se había sometido a filtración, para obtener una concentración de células secas. En un tubo de ensayo con tapón de rosca se pesó de manera precisa 20 mg aproximadamente de la parte de células secas, y se le añadieron 2 ml de una disolución de ácido clorhídrico-metanol y 1 ml de diclorometano, y se dejó reaccionar a 50°C durante 3 horas. Después de la reacción, se añadió hexano para extraer el éster metílico de los ácidos grasos, y la capa de hexano recuperada se concentró a presión reducida. El éster metílico de los ácidos grasos resultante se disolvió en una cantidad prescrita de acetonitrilo, se fraccionó por cromatografía de gases, y cada éster metílico de los ácidos grasos se cuantificó a partir del área de los picos. El resultado de la cuantificación se dividió por el valor pesado de manera precisa de la parte celular para obtener el contenido en cada uno de los ácidos grasos por célula seca. El contenido resultante de cada uno de los ácidos grasos se multiplicó por la concentración de células secas para obtener la cantidad producida de cada ácido graso.

Tabla 1

Nº del medio de cultivo	1-A	1-B	1-C
Fécula tratada con amilasa	12%	0%	0%
Fécula soluble	0%	12%	0%
Glucosa	0%	0%	12%
Soja en polvo	3%	3%	3%
Aceite de soja	0,2%	0,2%	0,2%
Agente antiespumante	0,1%	0,1%	0,1%
Cantidad producida de ácido araquidónico	4,2 g/l	1,2 g/l	4,3 g/l

Como se desprende de la tabla anterior, la cantidad producida de ácido araquidónico fue pequeña en un medio de cultivo que usa una fécula soluble, sin embargo, con el uso de una fécula sacarificada obtenida mediante el tratamiento de la fécula con amilasa, se obtuvo una elevada cantidad de ácido araquidónico producido, que es equivalente a la de un medio que usa glucosa.

Ejemplo 2

Como microorganismo productor de ácido araquidónico se usó *Mortierella* SAM2197 (FERM BP-6261). En un matraz de 500 ml se preparó un medio de cultivo (50 ml) que contiene el 24% de una fécula soluble y el 1,5% de extracto de levadura. El medio de cultivo (50 ml) se inoculó con 1×10^5 esporas de *Mortierella* SAM2197, inoculadas con cada una de diversas cantidades de una suspensión de esporas de *Aspergillus oryzae*, y se cultivaron durante 7 días a unas condiciones de 28°C y 160 rpm. Como control, se preparó como se ha descrito anteriormente un medio de cultivo que contiene el 12% de glucosa y el 1,5% de extracto de levadura, y se inoculó con *Mortierella* SAM2197 (FERMBP-6261), seguido del cultivo. El 5º día de cultivo, se añadió el 12% de glucosa, seguido del cultivo durante 7 días en unas condiciones de 28°C y 160 rpm. Como resultado del cultivo, como se muestra en la Tabla 2, la cantidad de ácido araquidónico producido fue de 0,56 g/l como mucho cuando la cantidad inoculada de suspensión de esporas de *Aspergillus oryzae* fue de 0,1 ml, que es casi dos veces más que en el caso en el que se usa una fécula soluble en un cultivo único de *Mortierella* (0,3 g/l), y es una cantidad de producción equivalente al caso en el que se usó glucosa como fuente de carbono para el cultivo único. Cuando la cantidad de inoculación de esporas de *Aspergillus* fue de 1 ml, se redujo la cantidad de ácido araquidónico producido, lo que sugiere que el crecimiento de *Mortierella* se puede ver afectado en algunos casos por la influencia del crecimiento de *Aspergillus*. Así, se ha demostrado que, en el caso del cultivo mixto de un microorganismo *Mortierella* y un microorganismo que produce enzimas sacarificantes, es preferible realizar el cultivo con este último microorganismo siendo el microorganismo principal.

Tabla 2

Fuente de carbono	Cantidad de inóculo de suspensión de esporas de <i>Aspergillus</i>	Cantidad de ácido araquidónico producido
Fécula soluble	0 ml	0,30 g/l
Fécula soluble	0,01 ml	0,50 g/l
Fécula soluble	0,1 ml	0,56 g/l
Fécula soluble	1 ml	0,16 g/l
Glucosa	0 ml	0,58 g/l

Ejemplo 3

Como microorganismo productor de ácido araquidónico se usó *Mortierella alpina* CBS754.68. En un matraz de 500 ml se preparó un medio de cultivo (50 ml) que contiene el 4,5% de cada uno de los diferentes azúcares mostrados en la Tabla 3, y el 1% de extracto de levadura, y se inoculó con 1×10^3 esporas, seguido del cultivo. El cultivo se realizó durante 5 días en unas condiciones de 28°C y 100 rpm. Se llevó a cabo un procedimiento para la sacarificación de la fécula (2), (7) y (8) de tal manera que se añadieron una α -amilasa y una pululanasa a una fécula, y se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Como α -amilasa, se usó Amilasa AD "Amano" 1 (fabricada por Amano Enzyme Inc.) y, como pululanasa, se usó Pululanasa "Amano" 3 (fabricada por Amano Enzyme Inc.).

Como resultado del cultivo, se obtuvieron las cantidades de ácido araquidónico producido mostradas en la Tabla 3, y se demostró que existe un intervalo preferible de grado sacarificación como se ha descrito anteriormente.

Tabla 3

Fuente de carbono	Relación de azúcar reductor/azúcar total	Cantidad producida de ácido araquidónico
Glucosa	100%	0,65 g/l
Fécula soluble (1)	0%	0,11 g/l
Fécula sacarificada (2)	18%	0,43 g/l
Fécula sacarificada (3)	27%	0,58 g/l
Fécula sacarificada (4)	33%	0,61 g/l
Fécula sacarificada (5)	50%	0,61 g/l
Fécula sacarificada (6)	55%	0,69 g/l
Fécula sacarificada (7)	80%	0,69 g/l
Fécula sacarificada (8)	92%	0,65 g/l

Detalles de la fuente de carbono

(1) Stabilose K, fabricada por Matsutani Chemical Industry Co., Ltd.

(2) Fécula sacarificada con α -amilasa y pululanasa

(3) Fujisyrup C-75S, fabricada por Kato Kagaku

(4) Fujisyrup C-75, fabricada por Kato Kagaku

(5) HMTP-75 (M-70), fabricada por Kato Kagaku

(6) A-75, fabricada por Kato Kagaku

(7) Fécula sacarificada con α -amilasa y pululanasa

(8) Fécula sacarificada con α -amilasa y pululanasa

Ejemplo 4

Como microorganismo productor de ácido araquidónico se usó *Mortierella alpina* CBS754.68. Se llevó a cabo un cultivo de siembra usando un medio de cultivo que contiene extracto de levadura y glucosa como fuente de nutrientes, y se inoculó en un medio de cultivo preparado en un tanque de cultivo de 50 l para su fermentación. La composición del medio de cultivo regular fue cualquiera de las tres composiciones de azúcares de 4-A, 4-B y 4-C mostradas en la Tabla 4, y la composición del medio común aparte del azúcar fue soja en polvo al 4%, aceite de soja al 0,1%, KH_2PO_4 al 0,3%, Na_2SO_4 al 0,1%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ al 0,05% y $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ al 0,05%. La relación de azúcar reductor/azúcar total de fécula sacarificada usada fue del 30%.

Como resultado del cultivo durante 10 días, las cantidades de ácido araquidónico producido en los medios de cultivo 4-A, 4-B y 4-C fueron de 13,5 g/l, 7 g/l y 13,3 g/l, respectivamente. Según lo elucidado por este resultado, con el uso de una fécula sacarificada, no sólo se puede conseguir evitar la inhibición del crecimiento debida a la alta concentración de glucosa, sino que también se puede conseguir una reducción de los costes para el cultivo debida a alimentaciones más bajas.

Tabla 4

Nº del medio de cultivo	4-A	4-B	4-C
Fuente de carbono	Glucosa	Glucosa	Fécula sacarificada
Concentración inicial de azúcar	1,8%	6%	6%
Concentración de azúcar suelto			
1 día suelto	4,1%	0%	0%
2 días suelto	4,1%	6%	6%
3 días suelto	3,6%	6%	6%
4 días suelto	2,7%	0%	0%
5 días suelto	1,7%	0%	0%
Fuente de carbono total	18%	18%	18%
Cantidad de ácido araquidónico producido	13,5 g/l	7,0 g/l	13,3 g/l

Ejemplo 5

5 Como microorganismo productor de ácido de Mead se usó *Mortierella alpina* SAM1861 (National Institute of Bioscience and Human-Technology, Nº de depósito condicional 3590, FERM BP-3590) y como microorganismo productor de ácido dihomo-γ-linolénico se usó *Mortierella alpina* SAM1860 (National Institute of Bioscience and Human-Technology, Nº de depósito condicional 3589, FERM BP-3589). En un matraz de 500 ml se preparó cada uno de los tres tipos de medios de cultivo (50 ml) mostrados en la Tabla 5, y se inocularon con 1×10^3 esporas para iniciar el cultivo. El cultivo se llevó a cabo durante 7 días a unas condiciones de 24°C y 100 rpm.

Tabla 5

Nº del medio de cultivo	5-A	5-B	5-C
Fécula sacarificada (*)	5%	0%	0%
Fécula soluble	0%	5%	0%
Glucosa	0%	0%	5%
Soja en polvo	1,5%	1,5%	1,5%
KH ₂ PO ₄	0,2%	0,2%	0,2%
Agente antiespumante	0,1%	0,1%	0,1%
Cepa: SAM1861			
Cantidad de ácido de Mead producido	0,44 g/l	0,12g/l	0,45 g/l
Cepa: SAM1860			
Cantidad de ácido dihomo-γ-linolénico producido	0,55 g/l	0,20 g/l	0,60 g/l

10 (*) Se usó fécula sacarificada con una relación de azúcar reductor/azúcar total igual al 35%.

En el caso en el que se usó una fécula soluble para el cultivo, tanto las cantidades de ácido de Mead producido como de ácido dihomo-γ-linolénico producido fueron bajas, no obstante, con el uso de una fécula sacarificada, se obtuvo una cantidad de producción elevada equivalente a la de un medio de cultivo de glucosa.

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

15 Según la presente invención, se usa una fécula que es más barata que la glucosa usada de manera convencional como fuente de carbono en el medio para el cultivo de un microorganismo *Mortierella*, pudiendo así reducir los costes de las materias primas de un medio de cultivo y, en consecuencia, se pueden reducir los costes para la producción de un lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados. Además, con el uso de una fécula

5

sacarificada como fuente de carbono en el medio, se puede eliminar el incremento de la presión osmótica en el medio de cultivo, dando como resultado un incremento del rendimiento de un lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados por fuente de carbono. Puesto que se puede eliminar el incremento de la presión osmótica como se ha mencionado anteriormente, en la presente invención no es necesario llevar a cabo un cultivo por alimentación, a diferencia del caso en el que se usa glucosa como fuente de carbono en el medio. Por tanto, se pueden reducir las instalaciones, el número de etapas y el tiempo de trabajo en la etapa de cultivo y, en consecuencia, se pueden reducir los costes para la producción de un lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la producción de un lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados, que comprende el cultivo de un microorganismo que pertenece al género *Mortierella* con el uso de un medio de cultivo que contiene una fécula sacarificada, y la recolección del lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados del cultivo,
5 en el que dicha fécula sacarificada tiene un grado de sacarificación del 30 al 90%.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la fécula sacarificada se obtiene tratando una fécula o una fécula soluble con una enzima sacarificante.
3. Un procedimiento para la producción de un lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados que comprende el cultivo de un microorganismo que pertenece al género *Mortierella* con el uso de un medio de cultivo que contiene (a) una fécula o una fécula soluble y (b) una enzima sacarificante, y la recolección de un lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados del cultivo,
10 en el que la fécula sacarificada producida a partir de dicha fécula o fécula soluble contenida en el medio de cultivo con dicha enzima sacarificante presenta un grado de sacarificación del 30 al 90% y se usa como fuente de carbono en el medio.
15
4. Un procedimiento para la producción de un lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados que comprende el cultivo mixto de un microorganismo *Mortierella* y microorganismo que pertenece al género *Aspergillus* con el uso de un medio de cultivo que contiene una fécula o una fécula soluble, y la recolección del lípido que contiene ácidos grasos altamente insaturados del cultivo,
20 en el que dicho microorganismo *Mortierella* se cultiva como microorganismo principal y dicho microorganismo que pertenece al género *Aspergillus* se cultiva como microorganismo auxiliar.
5. El procedimiento según la reivindicación 4, en el que el microorganismo que pertenece al género *Aspergillus* es *Aspergillus oryzae* o *Aspergillus kawachii*.
6. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el microorganismo que pertenece al género *Mortierella* es un microorganismo que pertenece al subgénero *Mortierella*.
25
7. El procedimiento según la reivindicación 6, en el que el microorganismo que pertenece al subgénero *Mortierella* es *Mortierella alpina* o *Mortierella alliacea*.
8. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el ácido graso altamente insaturado es uno o más ácidos grasos seleccionados del grupo constituido por ácido γ -linolénico, ácido dihomo- γ -linolénico, ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico, ácido de Mead, ácido 6,9-octadecadienoico y ácido 8,11-eicosadienoico.
30