

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 680**

51 Int. Cl.:

C12N 1/14 (2006.01)

C12P 7/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05781593 .8**

96 Fecha de presentación: **05.09.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1795586**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.06.2007**

54 Título: **Método de cultivo de hongos**

30 Prioridad:
06.09.2004 JP 2004258151

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.09.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.09.2012

73 Titular/es:
**NIPPON SUISAN KAISHA, LTD.
6-2, OTEMACHI 2-CHOME, CHIYODA-KU
TOKYO 100-8686, JP**

72 Inventor/es:
HIGASHIYAMA, Kenichi

74 Agente/Representante:
Arias Sanz, Juan

ES 2 387 680 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

Método de cultivo de hongos.

Antecedentes de la invención**1. Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a un método de cultivo de un hongo que produce al menos uno cualquiera de un ácido graso altamente insaturado y un compuesto que contiene un ácido graso altamente insaturado como ácido graso constituyente en un medio que contiene al menos una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno, usando un dispositivo de cultivo de aireación-agitación que puede ajustar y controlar la potencia de agitación y la cantidad de aireación tal como se define en las reivindicaciones.

10 2. Descripción de la técnica relacionada

En cultivo aerobio, un resultado de cultivo (por ejemplo, la productividad de ácido graso altamente insaturado (a continuación en el presente documento denominado "PUFA (ácido graso poliinsaturado)"), etc.) varía a menudo dependiendo del suministro de oxígeno. Por tanto, en el caso de ampliación a escala, se considera que el KLa (coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno) es un índice importante además de factores, tales como la
15 cantidad de aireación, velocidad de agitación y potencia requerida para la aireación-agitación.

El uso de KLa como índice en cultivos ampliados a escala se basa en la idea de que se obtiene el mismo resultado de cultivo independientemente del tipo y la escala de un recipiente de cultivo si la tasa de transferencia de oxígeno es la misma (véanse, por ejemplo, las publicaciones no patentes 1 y 2).

Se han propuesto diversas técnicas para medir el KLa, sin embargo, su operación es complicada. Cooper *et al.* han
20 propuesto un método de estimación de KLa de manera sencilla, en el que se usa una expresión aproximada $KLa = K(P/V)^{0.95}(Vs)^{0.67}$ (K: constante de proporcionalidad, P: potencia requerida para la agitación (W), V: cantidad de líquido (m^3), Vs: velocidad de flujo de aire (m/s)) (véase la publicación no patente 3).

(Publicación no patente 1) Satoshi Murakami *et al.*, Kagaku Kogaku Ronbunshu (Papers of Chemical Engineering), 26(4): 557-562 (2000).

25 (Publicación no patente 2) A. E. Humphery, Hakko Kogaku Kaishi (Journal of Fermentation Technology), 42: 334-345 (1964).

(Publicación no patente 3) C. M. Cooper *et al.*, Ind. Chem. Eng., 36: 504-509 (1944).

Problema que va a resolverse por la invención

30 El KLa puede predecirse usando la expresión aproximada anteriormente descrita propuesta por Cooper *et al.* Sin embargo, Cooper *et al.* obtuvieron una correlación entre el KLa y las condiciones operacionales usando un agitador de disco con 12 paletas. En sentido estricto, esta correlación no puede aplicarse a un recipiente de cultivo de un tipo diferente de dicho tipo.

35 Cooper *et al.* realizaron experimentos en agua. Por tanto, aunque la expresión aproximada es útil para el cultivo de bacterias, levadura o similares, que tienen un nivel bajo de reología, se considera que la expresión aproximada se aparta significativamente de la disolución de cultivo real que contiene hongos filamentosos, actinomicetos o similares, que tienen un alto nivel de reología.

40 La presente invención se proporciona para resolver los problemas descritos anteriormente. Un objeto de la presente invención es proporcionar un método de cultivo que pueda ampliarse a escala mientras se asegura la productividad satisfactoria de PUFA o un compuesto que contiene PUFA como componente sin calcular en realidad el KLa (coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno).

Compendio de la invención

45 Según la primera característica de la presente invención, se proporciona un método de cultivo de un hongo que cultiva un hongo, que produce al menos uno cualquiera de un ácido graso altamente insaturado o un compuesto que contiene un ácido graso altamente insaturado como ácido graso constituyente en un medio de cultivo que contiene al menos una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno, usando un dispositivo de cultivo de aireación-agitación que puede ajustar y controlar una potencia de agitación y una cantidad de aireación tal como se define en las reivindicaciones. El método comprende las etapas de realizar agitación mecánica durante un tiempo predeterminado tras el inicio del cultivo, en el que la potencia de agitación por cantidad de líquido unitaria es de $269 (W/m^3)$ o menos, y después de pasar el tiempo predeterminado, ajustar y controlar al menos una cualquiera de la cantidad de
50 aireación máxima y una potencia máxima requeridas para la agitación a un intervalo que satisfaga que $KLa (= (P/V)^{0.95}Vs^{0.67})$ es de 59 o más, que un parámetro de velocidad de flujo de aire $Vs^{0.67}$ es de 0,075 o más, y que un parámetro de potencia de agitación requerida $(P/V)^{0.95}$ es de 203 o más, en el que P representa la potencia

requerida para la agitación (W), V representa una cantidad de líquido (m^3) y Vs representa una velocidad de flujo de aire (m/s).

(Efecto operacional)

5 Según la primera característica de la presente invención, el cultivo puede realizarse usando un medio de cultivo que contiene al menos una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno, y el medio de cultivo puede prepararse de manera sistemática para que sea uniforme debido a la agitación mecánica. Como resultado, también es posible garantizar el crecimiento de células fúngicas y la reproducibilidad de la productividad de células fúngicas.

10 Puesto que el cultivo se realiza en un recipiente de cultivo de aireación-agitación, es posible cultivar eficazmente un microorganismo aerobio que produce al menos uno cualquiera de PUFA o un compuesto que contiene PUFA como componente (a continuación en el presente documento denominado "PUFA").

Puesto que el recipiente de cultivo de aireación-agitación puede ajustar y controlar la potencia de agitación y la cantidad de aireación, la concentración de oxígeno disuelto de disolución de cultivo puede ajustarse siempre que sea necesario en un intervalo que es adecuado para la producción de PUFA, por ejemplo.

15 Puesto que la agitación mecánica se realiza durante un tiempo predeterminado tras el inicio del cultivo en el que la potencia de agitación por cantidad de líquido unitaria es de 269 (W/m^3) o menos (es decir, esfuerzo cortante de agitación pequeña), es posible suprimir el daño físico en las hifas y células fúngicas con forma de gránulo de actinomicetos y hongos filamentosos. Como resultado, es posible cultivar estas células fúngicas de una forma que es adecuada para la producción de PUFA.

20 Una vez que ha pasado el tiempo predeterminado, se ajusta y controla al menos una cualquiera de la cantidad de aireación máxima o la potencia máxima requeridas para la agitación a un intervalo que satisfaga que $KLA (= (P/V)^{0,95} Vs^{0,67})$ es de 59 o más, que el parámetro de velocidad de flujo de aire $Vs^{0,67} [(m/s)^{0,67}]$ es de 0,075 o más y el parámetro de potencia de agitación requerida $(P/V)^{0,95} [(W/m^3)^{0,95}]$ es de 203 o más (P: potencia requerida para la agitación (W), V: cantidad de líquido (m^3), Vs: velocidad de flujo de aire (m/s)). De este modo, es posible cultivar más eficazmente un hongo que produce PUFA. Por tanto, puede potenciarse la productividad de PUFA. En otras palabras, cuando $KLA (= (P/V)^{0,95} Vs^{0,67})$ es más pequeño que 59, o cuando el parámetro de velocidad de flujo de aire $Vs^{0,67} [(m/s)^{0,67}]$ es más pequeño que 0,075, la cantidad de PUFA producidos (en este caso, ácido araquidónico) es pequeña tal como se muestra en las figuras 1 y 2. Además, una razón para ajustar el parámetro de potencia de agitación requerida $(P/V)^{0,95} [(W/m^3)^{0,95}]$ a 203 o más es que se pretende que la agitación se realice a una fuerza constante o más fuertemente que cuando se inicia el cultivo, preferiblemente más fuertemente que cuando se inicia el cultivo (tal como se muestra en los ejemplos 4-2 en la tabla 4, la potencia de agitación por cantidad de líquido unitaria es de 269 (W/m^3), es decir, el parámetro de potencia de agitación requerida $(P/V)^{0,95} [(W/m^3)^{0,95}]$ es de 203, al inicio del cultivo).

35 En el caso de la ampliación a escala, ajustando la cantidad de aireación máxima y la potencia máxima requeridas para la agitación basándose en los valores numéricos descritos anteriormente, puede obtenerse un cultivo de alta productividad con una cantidad de aireación mínima y una potencia de agitación mínima. De este modo, puede reducirse el coste de funcionamiento, dando como resultado la ampliación a escala con un nivel considerablemente alto de eficacia de producción.

Según la segunda característica de la presente invención, el ácido graso altamente insaturado es ácido araquidónico.

40 (Efecto operacional)

45 El ácido araquidónico representa aproximadamente el 10% de los ácidos grasos contenidos en un órgano importante, tal como sangre, hígado o similares (por ejemplo, en la sangre humana, la razón de ácidos grasos en fosfolípidos es tal como sigue: ácido araquidónico 11%, EPA 1% y DHA 3%). El ácido araquidónico es un componente principal de la membrana celular y está implicado en el ajuste de la fluidez de la membrana para mostrar diversas funciones en el metabolismo del cuerpo, y también desempeña un papel importante como precursor directo de prostaglandinas.

Particularmente de manera reciente, el ácido araquidónico ha atraído la atención debido a un papel de nutrición para lactantes y como ácido graso constituyente de cannabinoides endógenos (2-araquidonoil monoglicerol, anandamida), que muestra capacidad para activar los nervios.

50 El ácido linoleico procedente de alimentos ricos en ácido linoleico se convierte habitualmente en ácido araquidónico. Sin embargo, en pacientes adultos con enfermedad o pacientes potenciales, lactantes y ancianos, disminuye la función de una/unas enzima(s) implicada(s) en la biosíntesis, lo que conduce probablemente a una falta de ácido araquidónico. Por tanto, es deseable que el ácido araquidónico se tome directamente como grasa o aceite (un ácido graso constituyente de triglicéridos).

55 Según la segunda característica de la presente invención, es posible producir de manera eficaz y estable al menos

uno cualquiera de ácido araquidónico, que desempeña un papel importante para la nutrición de lactantes, o un compuesto (por ejemplo, grasas, aceites, etc.) que contienen ácido araquidónico como ácido graso constituyente. Por tanto, la presente invención puede contribuir al mantenimiento o estimulación de la salud pública mediante bebidas, alimentos con nutrientes terapéuticos, alimentación, productos farmacéuticos y similares que contienen estos materiales.

Según la tercera característica de la presente invención, el hongo que produce PUFA es del género *Mortierella*, subgénero *Mortierella*.

(Efecto operacional)

Según la tercera característica de la presente invención, usando un hongo que produce PUFA del género *Mortierella*, subgénero *Mortierella*, es posible producir PUFA más eficazmente, y además, los hongos pueden obtenerse fácilmente, tal como se describe a continuación y en otro lugar en el presente documento.

Según el cuarto aspecto de la presente invención, el tiempo predeterminado tras el inicio del cultivo es preferiblemente de 12 a 24 horas.

(Efecto operacional)

Según la cuarta característica de la presente invención, la agitación mecánica que tiene un nivel bajo de esfuerzo cortante de agitación (específicamente, la potencia de agitación por cantidad de líquido unitaria es de 269 (W/m³) o menos) se realiza durante de 12 a 24 horas tras el inicio del cultivo. Durante este periodo, puede hacerse que se realice eficazmente la transformación de un hongo que se transforma desde una hifa con forma de pulpa hasta una célula con forma de gránulo, suprimiendo de este modo un aumento significativo en la viscosidad de disolución de cultivo posterior. Por tanto, es posible producir más eficazmente PUFA.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una representación gráfica que indica una relación entre la cantidad de ácido araquidónico producido y un valor de KLA que se obtuvo en los cultivos.

La figura 2 es una representación gráfica que indica una correlación entre dos parámetros que constituyen el valor de KLA, es decir, valor de $(P/V)^{0.95}$ y valor de $Vs^{0.67}$.

Descripción de las realizaciones preferidas

Los ejemplos de un hongo que tiene capacidad para producir al menos uno cualquiera de PUFA o un compuesto que contiene PUFA como ácido graso constituyente (por ejemplo, grasa o aceite (triglicérido) y/o fosfolípido) incluyen el género *Mortierella*, el género *Conidiobolus*, el género *Pythium*, el género *Phytophthora*, el género *Penicillium*, el género *Cladosporium*, el género *Mucor*, el género *Fusarium*, el género *Aspergillus*, el género *Rhodotorula*, el género *Entomophthora*, el género *Echinosporangium* y el género *Saprolegnia*.

Particularmente, los ejemplos del hongo que pertenece al género *Mortierella*, subgénero *Mortierella* incluyen *Mortierella elongata*, *Mortierella exigua*, *Mortierella hygrophila*, *Mortierella alpina* y similares. Específicamente, pueden ilustrarse cepas fúngicas de *Mortierella elongate* IFO8570, *Mortierella exigua* IFO8571, *Mortierella hygrophila* IFO5941, *Mortierella alpina* IFO8568, ATCC16266, ATCC32221, ATCC42430, CBS219.35, CBS224.37, CBS250.53, CBS343.66, CBS527.72, CBS529.72, CBS608.70, CBS754.68 y similares.

Cualquiera de estas cepas fúngicas está disponible sin limitación del Institute of Fermentation, Osaka (IFO), American Type Culture Collection (ATCC) o Centrralbureau voor Schimmelcultures (CBS). Además, pueden usarse *Mortierella elongate* SAM0219 (FERM P-8703) (FERM BP-1239) y *Mortierella alpina* 1S-4, que se aislaron del suelo por el grupo de investigación de la presente invención. *Mortierella elongata* SAM 0219 está depositado internacionalmente según el Tratado de Budapest con número de registro FERM BP-1239 en el International Patent Organism Depository (IPOD), Japón.

Una cepa fúngica para su uso en la presente invención se cultiva (cultivo principal) inoculando una espora o una hifa de la cepa fúngica, o una disolución de cultivo de siembra obtenida mediante cultivo preliminar, o una célula fúngica recuperada del cultivo de siembra en el medio de cultivo líquido. En el caso del medio de cultivo líquido, como fuente de carbono puede usarse cualquiera de las que se usan comúnmente, tal como glucosa, fructosa, xilosa, sacarosa, maltosa, almidón soluble, melaza, glicerol, manitol, almidón sacarificado y similares. La presente invención no se limita a los mismos. Como fuente de nitrógeno pueden usarse fuentes de nitrógeno que se producen de manera natural (por ejemplo, peptona, extracto de levadura, extracto de malta, extracto de carne, casaminoácidos, licor de maceración de maíz, proteína de soja, soja desgrasada, harina de semilla de algodón, etc.), fuentes de nitrógeno orgánico (por ejemplo, urea, etc.), y fuentes de nitrógeno inorgánico (por ejemplo, nitrato de sodio, nitrato de amonio, sulfato de amonio, etc.). Particularmente, los ejemplos específicos de una fuente de nitrógeno obtenida de soja incluyen soja, soja desgrasada, copo de soja, proteína de soja comestible, harina de soja, tofu, harina de soja y similares. Particularmente, puede usarse soja desgrasada que se desnaturaliza por calor, más preferiblemente soja

desgrasada que se trata mediante calentamiento a aproximadamente de 70 a 90°C, seguido por la eliminación de componentes solubles en etanol, de manera individual o múltiple, o en combinación con las fuentes de nitrógeno descritas anteriormente.

5 Además, pueden usarse opcionalmente iones metálicos (por ejemplo, hierro, cobre, zinc, manganeso, níquel, cobalto, etc.), vitaminas y similares como una cantidad pequeña de fuente de nutrientes además del ión fosfato, ión potasio, ión sodio, ión magnesio e ión calcio. Estos componentes de medio de cultivo no están limitados particularmente si tienen una concentración que no inhibe el crecimiento de un microorganismo. En el uso práctico, la cantidad total de fuente(s) de carbono añadida(s) es generalmente del 0,1 al 40% en peso, preferiblemente del 1 al 25% en peso y la cantidad total de fuente(s) de nitrógeno añadida(s) es del 2 al 15% en peso, preferiblemente del 2 al 10% en peso. Más preferiblemente, la cantidad de partida de fuente(s) de carbono añadida(s) es del 1 al 5% en peso, y la concentración de fuente de nitrógeno de partida es del 3 al 8% en peso, y se añaden una/unas fuente(s) de carbono y una/unas fuente(s) de nitrógeno en algún/algunos punto(s) durante el cultivo (más preferiblemente, se añade sólo una fuente de carbono).

15 Obsérvese que, con el fin de aumentar la producción de ácido graso insaturado, pueden usarse compuestos hidrocarbonados, tales como hexadecano u octadecano; ácidos grasos, tales como ácido oleico o ácido linoleico, o una sal o un éster de ácido graso de los mismos (por ejemplo, éster etílico, éster de ácido graso de glicerina, éster de ácido graso de sorbitano); o grasas y aceites, tales como aceite de oliva, aceite de soja, aceite de colza, aceite de semilla de algodón o aceite de coco, como precursores del ácido graso insaturado, individualmente o en combinación. La cantidad añadida de estos sustratos es del 0,001 al 10% con respecto al medio de cultivo, preferiblemente del 0,5 al 10%. Estos sustratos pueden servir como la única fuente de carbono para el cultivo.

20 En la presente invención, la temperatura de cultivo varía dependiendo de los microorganismos usados. Por ejemplo, la temperatura de cultivo es de 5 a 40°C, preferiblemente de 20 a 30°C. Alternativamente, los microorganismos pueden cultivarse y crecer a de 20 a 30°C, seguido por un cultivo a de 5 a 20°C para producir ácido graso insaturado. Mediante un control de temperatura de este tipo, puede aumentar la proporción de ácido graso altamente insaturado en el ácido graso producido.

25 El cultivo de aireación-agitación, cultivo de agitación, cultivo sólido, o cultivo todavía líquido se realiza en cultivo de siembra, mientras que el cultivo de aireación-agitación se realiza en el cultivo principal. Al inicio del cultivo principal (en el momento de inocular la disolución de cultivo de siembra), el pH de medio de cultivo se ajusta a de 5 a 7, preferiblemente de 5,5 a 6,5. El periodo del cultivo principal es habitualmente de 2 a 30 días, preferiblemente de 5 a 20 días, y más preferiblemente de 5 a 15 días.

30 Tal como se define también en las reivindicaciones, el método de cultivo de la presente invención se realiza usando un dispositivo de cultivo de aireación-agitación que puede ajustar y controlar la potencia de agitación y la cantidad de aireación, y está equipado con un recipiente de cultivo y un agitador, en el que la razón (d/D) del diámetro de la paleta de agitación (=d) con respecto al diámetro del recipiente de cultivo (=D) es de 0,30 a 0,6, preferiblemente de 0,34 a 0,55, más preferiblemente de 0,37 a 0,55, y lo más preferiblemente de 0,42 a 0,55.

35 Se conoce que los microorganismos que pertenecen al género *Mortierella*, subgénero *Mortierella* pueden producir una grasa o un aceite (triglicérido) que tiene ácido araquidónico como ácido graso constituyente principal. Los presentes inventores han obtenido un microorganismo que puede producir grasa o aceite (triglicérido) que tiene ácido dihomo- γ -linoleico como ácido graso constituyente principal (documento JP H05-91887 A) y un microorganismo que puede producir una grasa o un aceite (triglicérido) que tiene ácido graso ω 9 altamente insaturado como ácido graso constituyente principal (documento JP H05-91888 A) introduciendo la mutación en la cepa fúngica descrita anteriormente. Los presentes inventores también han obtenido un microorganismo resistente a una fuente de carbono de concentración alta (documento WO98/39468). Estos microorganismos pertenecen al género *Mortierella*, subgénero *Mortierella* y la productividad de los mismos puede mejorarse mediante cultivo usando el método de cultivo de la presente invención.

45 Se describirá un resumen de un procedimiento de cultivo del cultivo principal que emplea el microorganismo, medio de cultivo y dispositivo de cultivo descritos anteriormente.

Al inicio del cultivo, el cultivo se lleva a cabo mientras se realiza agitación mecánica relativamente débil (potencia de agitación por cantidad de líquido unitaria: 269 (W/m³) o menos), y aireación.

50 En este caso, la cantidad de aireación no está limitada particularmente. Cuando se cultivan actinomicetos u hongos filamentosos en líquido en condiciones aerobias, los microorganismos pueden cambiar sus formas desde una hifa con forma de pulpa hasta una célula fúngica con forma de gránulo (denominada también hifa esférica) cuando avanza desde la fase vegetativa hasta la fase productiva.

55 Tal como se usa en el presente documento, la célula fúngica con forma de gránulo se refiere a una forma fúngica de actinomicetos y hongos filamentosos cuando se cultivan en medio de cultivo líquido, indicando específicamente una agregación de hifas con forma fusiforme o esférica que tienen un diámetro promedio de 0,2 a varios milímetros.

Tal como se usa en el presente documento, la hifa con forma de pulpa se refiere a una forma fúngica típica de

actinomicetos y hongos filamentosos cuando se cultivan en medio de cultivo líquido, indicando específicamente que la hifas alargadas se distribuyen de manera lineal o radial. La transformación desde la hifa con forma de pulpa hasta la célula fúngica con forma de gránulo está estrechamente relacionada con la productividad de PUFA.

5 Si la agitación mecánica que tiene esfuerzo cortante de agitación alta destruye la forma fúngica con forma de gránulo o interfiere con la transformación hasta la forma de gránulo, la viscosidad de la disolución de cultivo aumenta con el crecimiento de las células fúngicas, lo que conduce a una reducción en la eficacia de mezclado. Como resultado, se considera que no es probable que se suministre suficientemente oxígeno o similar a las células fúngicas, lo que conduce a una reducción en la productividad de PUFA.

10 De manera convencional, con el fin de promover la transformación a la forma de gránulo, se estudia una composición de medio de cultivo óptima o se ajusta la presión parcial de oxígeno en el gas de aireación. En la presente invención, se realiza agitación que tiene esfuerzo cortante de agitación baja durante un tiempo predeterminado desde el inicio del cultivo, promoviendo de este modo la transformación de las células fúngicas a la forma de gránulo.

15 El dispositivo de aireación-agitación está equipado con un sensor de detección de concentración de oxígeno disuelto para monitorizar la concentración de oxígeno disuelto de la disolución de cultivo.

La concentración de oxígeno disuelto (OD) del medio de cultivo empieza a disminuir con el crecimiento de las células fúngicas. Sin embargo, la potencia de agitación y la cantidad de aireación aumentan inmediatamente antes de que el valor de OD alcance el límite más bajo (aproximadamente el 50%) por encima del cual no se influye en la productividad de PUFA, ajustando y manteniendo de este modo el valor de OD.

20 Una cantidad de tiempo requerido para alcanzar el límite más bajo del valor de OD es aproximadamente de 12 a 24 horas tras el inicio del cultivo. Después, el cultivo se realiza mientras se ajusta y se controla al menos una de la cantidad de aireación máxima o la potencia máxima requeridas para la agitación a un intervalo que satisfaga que $KLA (= (P/V)^{0.95} V_s^{0.67})$ es de 59 o más, que el parámetro de velocidad de flujo de aire $V_s^{0.67}$ [unidad: (m/s)^{0.67}] es de 0,075 o más, y que el parámetro de potencia de agitación requerida $(P/V)^{0.95}$ [unidad: (W/m³)^{0.95}] es de 203 o más.
25 Como ejemplo específico del ajuste y control, se considera que aumenta(n) cualquiera o ambas de la cantidad de aireación máxima y la potencia máxima requeridas para la agitación.

30 Tal como se usa en el presente documento, el valor de KLA se refiere a un parámetro que se ha introducido recientemente por los presentes inventores basándose en la expresión aproximada de Cooper *et al.*, KLa (coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno) = $K(P/V)^{0.95} (V_s)^{0.67}$. Los presentes inventores encontraron por primera vez que existe una correlación satisfactoriamente positiva entre el valor de KLA y la cantidad de PUFA producidos.

35 Aproximadamente de 40 a 48 horas tras el inicio del cultivo, se agota(n) el/los nutriente(s) (particularmente, una fuente de nitrógeno) en el medio de cultivo y la concentración de células fúngicas alcanza el valor más alto, y las células fúngicas se transforman desde la fase vegetativa hasta la fase de producción de PUFA, en la que se promueve la acumulación de PUFA en las células fúngicas.

A continuación, el cultivo se realiza durante de 5 a 15 días mientras se añade medio de cultivo de glucosa siempre que sea necesario durante el cultivo. Tras el final del cultivo, las células fúngicas se recuperan y secan, seguido por extracción con hexano de las células fúngicas secas para obtener al menos uno cualquiera de PUFA y un compuesto (por ejemplo, triglicérido, fosfolípido, etc.) que contiene PUFA como ácido graso constituyente.

40 (Ejemplos)

Ejemplo 1 (Medición de la potencia requerida para la agitación)

45 Se echó agua del grifo (6 kl (=V)) en un recipiente de cultivo de aireación-agitación de 10 kl de capacidad. Se midió el consumo de potencia de agitación (=A) con aireación de 1 vvm cuando se realiza la agitación a diversas velocidades rotacionales de agitación. A continuación, se realizó la operación sin carga con las mismas velocidades rotacionales en el mismo recipiente, y se midió el consumo de la potencia de agitación (=B). Durante la operación sin carga, con el fin de impedir que el árbol de agitación se recalentara, se echó agua hasta un nivel tal que la superficie de agua era más baja que el agitador, y se sumergió la parte del cojinete inferior del árbol de agitación en el agua.

Se midió la potencia efectiva usando un medidor de potencia (medidor de potencia de abrazadera fabricado por Hioki E. E. Corporation) que se proporcionó en un lado de primer orden (lado de fuente de potencia) de un inversor.

50 Se supone que un valor obtenido mediante la resta del valor B del valor A es la potencia requerida para la agitación (=P). El valor P se divide por una cantidad de líquido para obtener la potencia requerida para la agitación por cantidad de líquido (=P/V). Los valores medidos realmente así calculados se muestran en una tabla a continuación.

Tabla 1

velocidad rotacional de agitación (rpm)(=N)	consumo de potencia cuando se echó agua (kW) (=A)	consumo de potencia durante la operación sin carga (kW) (=B)	potencia requerida para la agitación (kW) (P=A-B)	potencia requerida para la agitación por cantidad de líquido (kW/m ³) (P/V)
35	1,660	0,630	1,030	0,172
65	6,804	1,050	5,754	0,959
95	17,528	1,498	16,030	2,672

Se representaron gráficamente los valores medidos realmente en un gráfico en el que el eje horizontal indica la velocidad rotacional de agitación (=N), mientras que el eje vertical indica la potencia requerida para la agitación por cantidad de líquido (=P/V), y se obtuvieron los parámetros X e Y de una expresión aproximada $P/V = XN^Y$ mediante el método de mínimos cuadrados. Los valores X e Y y la expresión aproximada así obtenida se usaron para calcular la potencia requerida para la agitación por cantidad de líquido unitaria con respecto a una velocidad rotacional de agitación arbitraria.

Quando se detuvo la aireación al recipiente de cultivo, se observó un aumento en la potencia requerida para la agitación. Usando un método similar al descrito anteriormente, se obtuvieron los valores X e Y en ausencia de aireación, y se calculó la potencia requerida para la agitación por cantidad de líquido con respecto a una velocidad rotacional de agitación arbitraria.

Ejemplo 2 (Potencia requerida para la agitación de una disolución de cultivo)

Se cultivó un hongo que produce ácido araquidónico, cepa de *Mortierella alpina* 1S-4, en un recipiente de cultivo de 10 kl. Se midió el consumo de potencia de agitación en 6 kl de disolución de cultivo y con aireación de 1 vvm cuando se realizó la agitación con diversas velocidades rotacionales de agitación. Los resultados se muestran en una tabla a continuación.

Tabla 2

velocidad rotacional de agitación (rpm) (=N)	consumo de potencia cuando se echó agua (kW) (=A)
35	1,720
65	6,700
95	17,612

Comparando la potencia de agitación obtenida en los ejemplos 1 y 2, se confirmó que la potencia de agitación no es significativamente diferente entre cuando se realizó la operación en la que se echó agua (ejemplo 1) y cuando se realizó la operación en la que se echó la disolución de cultivo (ejemplo 2). Por tanto, se consideró que la potencia requerida para la agitación durante el cultivo puede aproximarse con la potencia requerida para la agitación obtenida cuando se realizó la operación en el mismo recipiente de cultivo en el que se echó agua.

(Ejemplo 3)

Se inculó una suspensión de esporas de la cepa de *M. alpina* 1S-4 a una concentración del 0,1% en volumen (% en vol.) en un medio de cultivo que contiene 1,0% de extracto de levadura y 2,0% de glucosa y que tiene un pH de 6,3. Se inició un cultivo de siembra con agitación recíproca a 100 rpm a una temperatura de 28°C (primera fase), y se realizó durante 3 días.

A continuación, se prepararon 30 l de un medio de cultivo que contiene 1% de extracto de levadura, 2% de glucosa, 0,1% de aceite de soja, y que tiene un pH de 6,3 en un recipiente de cultivo de aireación-agitación de 50 l de capacidad. Se inculó el medio de cultivo con la disolución de cultivo de siembra (primera fase), y se inició el cultivo de siembra (segundo estado) cuando la velocidad rotacional de agitación fue de 200 rpm, la temperatura fue de 28°C y la presión del recipiente fue de 150 kPa, y se realizó durante 2 días.

A continuación, se preparó un medio de cultivo para el cultivo principal en un recipiente de agitación-aireación de 10 kl de capacidad (el diámetro interno del recipiente de cultivo es de 1,8 m). Se preparó el medio de cultivo de la siguiente manera. Inicialmente, se prepararon 4500 l de un medio de cultivo (medio de cultivo A: harina de soja 336 kg; KH₂PO₄ 16,8 kg; MgCl₂·6H₂O 2,8 kg; CaCl₂·2H₂O 2,8 kg; aceite de soja 5,6 kg) a pH 4,5, y se esterilizó en el

recipiente del cultivo principal a 121°C durante 20 minutos. Se esterizaron 1000 l de otro medio de cultivo (medio de cultivo B: agua que contiene glucosa 112 kg) en otro recipiente de cultivo a 121°C durante 20 minutos, y se transfirió entonces de manera estéril al recipiente del cultivo principal para añadirse al medio de cultivo A (el medio de cultivo tras la adición se denomina medio de cultivo C). Se añadió de manera estéril disolución de hidróxido de sodio acuosa esterilizada al medio de cultivo C y se ajustó a pH 6,1, y después, se inoculó la disolución de cultivo de siembra (segunda fase) que tiene una capacidad volumétrica de 28 l al medio de cultivo C mediante manipulación estéril, dando como resultado un total de 5600 l (cantidad de líquido de cultivo de partida) (el recipiente de cultivo tiene una capacidad volumétrica de 10 kl). Se inició el cultivo cuando la temperatura fue de 26°C, la presión interna fue de 200 kPa, la cantidad de aireación fue de 49 m³/h (la velocidad de flujo de aire (=Vs) fue de 0,00535 m/s), la potencia requerida para la agitación por cantidad de líquido (=P/V) fue de 112 W/m³. Los valores de los parámetros en el momento del inicio del cultivo se calcularon tal como sigue.

(Expresión 1)

$$(P/V)^{0,95}: 89 [(W/m^3)^{0,95}]$$

$$Vs^{0,67}: 0,03 [(m/s)^{0,67}]$$

$$15 \quad KLA (=P/V)^{0,95}Vs^{0,67}: 2,67 [(W/m^3)^{0,95} (m/s)^{0,67}]$$

Se cambió la potencia de agitación (=P/V) a 880 W/m³ en la hora 15 de cultivo, y la cantidad de aireación y la velocidad rotacional de agitación aumentaron gradualmente hasta que la cantidad de aireación fue de 437 m³/h (velocidad de flujo de aire (=Vs): 0,0477 m/s) y la potencia de agitación (=P/V) fue de 3250 W/m³, hacia la hora 40 del cultivo. Los valores de los parámetros en el nivel de aireación-agitación alto se calcularon tal como sigue.

20 (Expresión 2)

$$(P/V)^{0,95}: 2169 [(W/m^3)^{0,95}]$$

$$Vs^{0,67}: 0,130 [(m/s)^{0,67}]$$

$$KLA (=P/V)^{0,95}Vs^{0,67}: 282 [(W/m^3)^{0,95} (m/s)^{0,67}]$$

25 Se realizó el cultivo principal durante 306 horas mientras se añadía medio de cultivo en algún/algunos punto(s) durante el cultivo tal como se describe a continuación. Al final del cultivo, la cantidad de líquido de cultivo fue de 7750 l debido a la adición (aumento) y la evaporación (disminución) de medio de cultivo.

Tabla 3

tiempo del cultivo principal	medio de cultivo añadido
tras 19 horas	agua que contiene glucosa 280 kg/460 l
tras 43 horas	agua que contiene glucosa 280 kg/450 l
tras 67 horas	agua que contiene glucosa 252 kg/390 l
tras 91 horas	agua que contiene glucosa 252 kg/410 l
tras 120 horas	agua que contiene glucosa 224 kg/370 l
tras 140 horas	agua que contiene glucosa 168 kg/280 l
tras 163 horas	agua que contiene glucosa 168 kg/270 l

30 Tras el cultivo, se realizó la esterilización a 120°C durante 20 minutos, y después, se recuperaron las células fúngicas húmedas usando un hidroextractor continuo, seguido por secado con aire caliente (temperatura del aire caliente: 120°C) usando un secador de lecho fluidizado con agitación hasta un contenido en agua del 2% en peso (% en peso). Se enfrió la célula fúngica seca hasta 40°C en un lecho fluidizado mediante suministro de aire ambiental, y luego se transportó a un lugar de carga usando un transportador neumático. La célula fúngica seca resultante se cargó junto con gas nitrógeno en una bolsa de depósito de aluminio (bolsa) que tiene una capacidad volumétrica de aproximadamente 1 m³, y la abertura de la bolsa se selló mediante calor. La bolsa se conservó a 10°C o menos en un refrigerador.

40 La célula fúngica seca eliminada de la bolsa de depósito se sometió a extracción con hexano. Se filtró la disolución de hexano para eliminar los componentes sólidos de la misma. Después, se calentó la disolución resultante a presión reducida para eliminar el hexano, obteniendo de este modo aceite bruto que tiene ácido araquidónico como ácido graso constituyente.

Ejemplo 4 (Influencia de la potencia requerida para la agitación al inicio del cultivo)

Se realizó el cultivo de siembra y se preparó un medio de cultivo para el cultivo principal usando un método similar al del ejemplo 3. Se realizó el cultivo principal en las mismas condiciones que las del ejemplo 3, excepto que las condiciones para la agitación al inicio del cultivo se fijaron para que fueran diversos valores tal como se muestra en una tabla a continuación.

5

Según el resultado del cultivo, se encontró que el valor de P/V al inicio del cultivo tiene un nivel significativo de influencia en la producción de ácido araquidónico.

Tabla 4

experimento n.º	condiciones al inicio del cultivo		resultado del cultivo
	potencia de agitación requerida por cantidad de líquido al inicio del cultivo P/V (W/m ³)	parámetro (P/V) ^{0,95} [(W/m ³) ^{0,95}]	cantidad de ácido araquidónico producido por cantidad de disolución de cultivo (*) (g/l)
Ej. 4-1	41	34	22,4
Ej. 4-2	269	203	22,40
Ej. 4-3	810	579	17,0
Ej. 4-4	3250	2169	14,1
Ej. 3 (ejemplo 3)	112	89	22,8

(*) los valores están corregidos mediante la siguiente expresión puesto que la cantidad de disolución de cultivo varía de un cultivo a otro, dependiendo de la evaporación y la adición de glucosa.

10

(Expresión 3)

Cantidad de ácido araquidónico producido (valor corregido) = cantidad de ácido araquidónico producido por disolución de cultivo al final del cultivo x cantidad de líquido al final del cultivo / cantidad de líquido al inicio del cultivo

Ejemplo 5 (Influencia de la cantidad de aireación al inicio del cultivo)

Se realizó el cultivo de siembra y se preparó un medio de cultivo para el cultivo principal usando un método similar al del ejemplo 3. Se realizó el cultivo principal en las mismas condiciones que las del ejemplo 3, excepto que las condiciones para la aireación al inicio del cultivo se fijaron para que fueran diversos valores tal como se muestra en una tabla a continuación. En ambos experimentos, los ejemplos 5-1 y 5-2, puesto que la cantidad de aireación se fijó para que fuera alta desde el inicio del cultivo, se observó un nivel considerablemente alto de tendencia a producir burbujas en comparación con el ejemplo 3 hasta la hora 20 del cultivo tras el inicio. Por tanto, se adoptó un método de suspensión de la aireación de manera intermitente con el fin de suprimir el burbujeo.

15

20

25

30

35

Cuando se realizó la aireación, se produjo burbujeo y la altura de las burbujas empezó a aumentar. Se detuvo la aireación en la disolución inmediatamente después de que la altura de las burbujas ascendió cerca de la parte superior del recipiente (cerca de una tubería de escape). Cuando se detuvo la aireación, la altura de las burbujas empezó a caer, y al mismo tiempo, la concentración de oxígeno disuelto (OD) de la disolución de cultivo también empezó a disminuir. Se inició de nuevo la aireación inmediatamente antes de que el valor de OD alcanzara el límite más bajo por encima del cual no se influye en la productividad de ácido araquidónico. Se repitieron operaciones similares hasta que la tendencia a burbujear desapareció sustancialmente. Una velocidad de flujo de aire Vs en el ejemplo 5 es una velocidad de flujo de aire cuando se realiza la aireación, pero no una cantidad acumulada promedio de aireación obtenida teniendo en cuenta la aireación intermitente. El límite más bajo del valor de OD por encima del cual no se influye en la productividad de ácido araquidónico es una concentración de OD (concentración de OD crítica) por debajo de la cual se pierde una relación lineal entre una disminución del OD debido a la suspensión de la aireación y un tiempo transcurrido. Se obtuvo previamente la concentración de OD crítica usando un método de medición dinámico ("Hakkokogaku no Kiso (Principles of Fermentation Technology)", 1988, Gakkai Shuppan Senta, traducido por Ayaaki Ishizaki), en el que el cultivo se realizó en las mismas condiciones.

Según el resultado del cultivo, se confirmó que el valor de Vs al inicio del cultivo no influye sustancialmente en la producción de ácido araquidónico.

Tabla 5

experimento n.º	condiciones al inicio del cultivo		resultado del cultivo
	velocidad de flujo de aire al inicio del cultivo Vs (m/s)	parámetro $Vs^{0,67}$ [(m/s) ^{0,67}]	cantidad de ácido araquidónico producido por cantidad de disolución de cultivo (*) (g/l)
Ej. 5-1	0,0196	0,0719	22,3
Ej. 5-2	0,0477	0,130	22,6
Ej. 3 (ejemplo 3)	0,00535	0,0301	22,8

(*) los valores están corregidos mediante la siguiente expresión puesto que la cantidad de disolución de cultivo varía de un cultivo a otro, dependiendo de la evaporación y la adición de glucosa.

(Expresión 4)

5 Cantidad de ácido araquidónico producido (valor corregido) = cantidad de ácido araquidónico producido por disolución de cultivo al final del cultivo x cantidad de líquido al final del cultivo / cantidad de líquido al inicio del cultivo

Ejemplo 6 (Influencia del valor de KLA más alto)

10 Se realizó el cultivo de siembra y se preparó un medio de cultivo para el cultivo principal usando un método similar al del ejemplo 3. Se inició el cultivo cuando la temperatura fue de 26°C, la presión interna fue de 200 kPa, la cantidad de aireación fue de 49 m³/h (la velocidad de flujo de aire (=Vs) fue de 0,00535 m/s), y la potencia requerida para la agitación por cantidad de líquido de cultivo (=P/V) fue de 112 W/m³ como en el ejemplo 3. Los valores de los parámetros en el momento del inicio del cultivo se calcularon tal como sigue.

(Expresión 5)

$$(P/V)^{0,95}: 89 [(W/m^3)^{0,95}]$$

$$Vs^{0,67}: 0,03 [(m/s)^{0,67}]$$

15 KLA (=P/V)^{0,95}Vs^{0,67}: 2,67 [(W/m³)^{0,95} (m/s)^{0,67}]

20 Se cambió la potencia requerida para la agitación (=P/V) a 380 W/m³ en la hora 18 de cultivo, y después, la cantidad de aireación y la velocidad rotacional de agitación aumentaron gradualmente hacia la hora 48 del cultivo. El cultivo se realizó en diversas condiciones de la más alta potencia de agitación y cantidad de aireación máxima. La figura 1 es una representación gráfica que indica una relación entre la cantidad de ácido araquidónico producido en cada cultivo y el valor de KLA (=P/V)^{0,95}Vs^{0,67} más alto. Según esta representación gráfica, se encontró que existe una correlación satisfactoriamente positiva entre el valor de KLA y la cantidad de ácido araquidónico producido. En la figura 1, también se encontró que hubo algunos casos en los que la cantidad de ácido araquidónico producido fue de tan solo aproximadamente de 15 a 16 g/l aunque el valor de KLA aumentara hasta 100 o más (por ejemplo, puntos dentro de un intervalo indicado con A en la figura 1), y también existieron algunos casos que se apartaban de la correlación entre el KLA y la cantidad de ácido araquidónico producido. Para examinar la razón, se produjo una representación gráfica de los dos parámetros, el valor de (P/V)^{0,95} y el valor de Vs^{0,67}, que constituye el valor de KLA (figura 2). En este caso, los puntos dentro de un intervalo indicados con A' en la figura 2 corresponden a los puntos dentro del intervalo indicado con A en la figura 1. Como resultado, se encontró que si el valor de KLA es alto, pero el valor de Vs^{0,67} no es de 0,075 o más, el aumento del valor de KLA no conduce al efecto de aumentar la cantidad de ácido araquidónico producido.

Ejemplo 7

35 Se realizó el cultivo de siembra de manera similar al del ejemplo 3. Se prepararon 1300 l de un medio de cultivo para el cultivo principal que tiene las mismas concentraciones de componentes que las del ejemplo 3 en un recipiente de cultivo de 2 kl de capacidad. Se inició el cultivo cuando la temperatura fue de 26°C, la presión interna fue de 200 kPa, la velocidad de flujo de aire fue de 0,0087 (m/s) y la potencia requerida para la agitación por cantidad de líquido de cultivo (=P/V) fue de 264 W/m³. Los valores de los parámetros en el momento del inicio del cultivo se calcularon tal como sigue.

(Expresión 6)

$$(P/V)^{0,95}: 199 [(W/m^3)^{0,95}]$$

40 Vs^{0,67}: 0,042 [(m/s)^{0,67}]

$$KLA (=P/V)^{0,95}Vs^{0,67}: 8,28 [(W/m^3)^{0,95} (m/s)^{0,67}]$$

- 5 Se cambió la potencia requerida para la agitación (=P/V) a 890 W/m³ en la hora 24 de cultivo, y después, la cantidad de aireación y la velocidad rotacional de agitación aumentaron gradualmente hasta que la velocidad de flujo de aire Vs fue de 0,084 (m/s) y la potencia de agitación P/V fue de 1493 W/m³, hacia la hora 48 del cultivo. Los valores de los parámetros en el nivel de aireación-agitación alto se calcularon tal como sigue.

(Expresión 7)

$$(P/V)^{0,95}: 1036 [(W/m^3)^{0,95}]$$

$$Vs^{0,67}: 0,191 [(m/s)^{0,67}]$$

$$KLA (=P/V)^{0,95}Vs^{0,67}: 198 [(W/m^3)^{0,95} (m/s)^{0,67}]$$

- 10 Se realizó el cultivo principal durante 306 horas mientras se añadía glucosa que tiene la misma concentración que la del ejemplo 3 en algún/algunos punto(s) durante el cultivo. Como resultado, se obtuvieron 20,0 g/l de ácido araquidónico producido (valor corregido).

Ejemplo 8

- 15 Se usó la cepa de *Mortierella alpina* CBS754.68 como hongo que produce ácido araquidónico. La cepa fúngica conservada se usó para realizar el cultivo de siembra y se preparó un medio de cultivo para el cultivo principal usando un método similar al del ejemplo 3. Se inició el cultivo cuando la temperatura fue de 26°C, la presión interna fue de 200 kPa, la cantidad de aireación fue de 49 m³/h (la velocidad de flujo de aire (=Vs) fue de 0,00535 m/s) y la potencia requerida para la agitación por cantidad de líquido de cultivo (=P/V) fue de 112 W/m³. Los valores de los parámetros en el momento del inicio del cultivo se calcularon tal como sigue.

- 20 (Expresión 8)

$$(P/V)^{0,95}: 89 [(W/m^3)^{0,95}]$$

$$Vs^{0,67}: 0,03 [(m/s)^{0,67}]$$

$$KLA (=P/V)^{0,95}Vs^{0,67}: 2,67 [(W/m^3)^{0,95} (m/s)^{0,67}]$$

- 25 Se inició el cultivo en estas condiciones y se cambió la velocidad rotacional de agitación de partida en diferentes momentos, de modo que el cultivo se realizó una pluralidad de veces (experimentos n.^{os}. Ej. 6-1 a 6-4). Cuando la velocidad rotacional de agitación de partida se cambió por primera vez, se cambió la potencia de agitación (=P/V) a 380 W/m³, y después, la cantidad de aireación y la velocidad rotacional de agitación aumentaron gradualmente hasta que la cantidad de aireación máxima fue de 437 m³/h (la velocidad de flujo de aire (=Vs): 0,0477 m/s) y la potencia de agitación máxima (=P/V) fue de 3250 W/m³, hacia la hora 48 del cultivo. Los valores de los parámetros en el nivel de aireación-agitación alto se calcularon tal como sigue.

- 30

(Expresión 9)

$$(P/V)^{0,95}: 2169 [(W/m^3)^{0,95}]$$

$$Vs^{0,67}: 0,130 [(m/s)^{0,67}]$$

$$KLA (=P/V)^{0,95}Vs^{0,67}: 282 [(W/m^3)^{0,95} (m/s)^{0,67}]$$

- 35 Se realizó el cultivo principal durante 288 horas mientras se añadía glucosa en algún/algunos punto(s) durante el cultivo como en el ejemplo 3.

Como resultado del cultivo, se encontró que el momento en que la potencia de agitación se cambió por primera vez tras el inicio del cultivo tiene una influencia significativa en la producción de ácido araquidónico.

Tabla 6

experimento n.º	primer momento de cambio de la potencia de agitación (tiempo transcurrido desde el inicio del cultivo (inoculación de cultivo de siembra))	resultado del cultivo (*) cantidad de ácido araquidónico producido por cantidad de disolución de cultivo (g/L)
Ej. 6-1	6 h	10,1
Ej. 6-2	12 h	18,5
Ej. 6-3	24 h	18,7
Ej. 6-4	30 h	9,5

(*) los valores están corregidos mediante la siguiente expresión puesto que la cantidad de disolución de cultivo varía de un cultivo a otro, dependiendo de la evaporación y la adición de glucosa.

(Expresión 10)

5 Cantidad de ácido araquidónico producido (valor corregido) = cantidad de ácido araquidónico producido por disolución de cultivo al final del cultivo x cantidad de líquido al final del cultivo / cantidad de líquido al inicio del cultivo

Ejemplo 9 (Producción de DGLA)

10 Se usó la cepa de *Mortierella alpina* SAM1860 como hongo que produce ácido dihomo- γ -linoleico. Se inoculó la cepa fúngica conservada en un medio de cultivo que contiene 1% de extracto de levadura y 2% de glucosa y que tiene un pH de 6,3, que se preparó en un matraz, seguida por el cultivo de siembra (primera fase) a 100 rpm a 28°C durante 3 días. A continuación, se prepararon 30 l de un medio de cultivo que contiene 1% de extracto de levadura, 2% de glucosa y 0,1% de aceite de soja y que tiene un pH de 6,3 en un recipiente de cultivo de aireación-agitación de 50 l de capacidad, y se inoculó con la disolución de cultivo obtenida previamente por el cultivo de siembra (primera fase), seguido por el cultivo de siembra (segunda fase) durante 2 días en el que la velocidad rotacional de agitación fue de 200 rpm, la temperatura fue de 28°C y la presión interna del recipiente fue de 150 kPa.

15 A continuación, se inoculó un medio de cultivo que contiene 4% de harina de soja desgrasada, 1,8% de glucosa, 0,3% de KH_2PO_4 , 0,1% de Na_2SO_4 , 0,05% de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,05% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 0,1% de aceite de soja y que tiene un pH de 6,1 con un 0,5% de la disolución de cultivo de siembra (segunda fase). Se inició el cultivo principal con 4000 l (cantidad de líquido) del medio de cultivo.

20 Se inició el cultivo cuando la temperatura fue de 26°C, la presión interna fue de 200 kPa, la cantidad de aireación fue de 52 m³/h (la velocidad de flujo de aire (=Vs) fue de 0,0057 m/s) y la potencia requerida para la agitación por cantidad de líquido de cultivo (=P/V) fue de 30 W/m³. Los valores de los parámetros en el momento del inicio del cultivo se calcularon tal como sigue.

(Expresión 11)

$$(P/V)^{0,95}: 25 [(W/m^3)^{0,95}]$$

25 $Vs^{0,67}: 0,0313 [(m/s)^{0,67}]$

$$KLA (= (P/V)^{0,95} Vs^{0,67}): 0,782 [(W/m^3)^{0,95} (m/s)^{0,67}]$$

30 Se inició el cultivo en estas condiciones. La potencia de agitación se cambió en la hora 19 de cultivo tras el inicio del cultivo, y la cantidad de aireación y la velocidad rotacional de agitación aumentaron gradualmente hasta que la cantidad de aireación máxima fue de 240 m³/h (la velocidad de flujo de aire (=Vs): 0,0262 m/s) y la potencia de agitación máxima (=P/V) fue de 1251 W/m³, hacia la hora 48 del cultivo. Los valores de los parámetros en el nivel de aireación-agitación alto se calcularon tal como sigue.

(Expresión 12)

$$(P/V)^{0,95}: 875,9 [(W/m^3)^{0,95}]$$

$$Vs^{0,67}: 0,0871 [(m/s)^{0,67}]$$

35 $KLA (= (P/V)^{0,95} Vs^{0,67}): 76,3 [(W/m^3)^{0,95} (m/s)^{0,67}]$

Se realizó el cultivo principal durante 160 horas mientras se añadía glucosa en algún/algunos punto(s) durante el cultivo. Como resultado, la concentración de ácido dihomo- γ -linoleico producido fue de 7,0 g/l al final del cultivo.

Ejemplo 10 (Producción de ácido eicosatrienoico)

Se usó la cepa de *Mortierella alpina* SAM2086 como hongo que produce ácido eicosatrienoico. Se inoculó la cepa fúngica conservada en un medio de cultivo que contiene 1% de extracto de levadura y 2% de glucosa y que tiene un pH de 6,3, que se preparó en un matraz, seguida por el cultivo de siembra (primera fase) a 100 rpm a 28°C durante 3 días. A continuación, se prepararon 30 l de un medio de cultivo que contiene 1% de extracto de levadura, 2% de glucosa y 0,1% de aceite de oliva y que tiene un pH de 6,3 en un recipiente de cultivo de aireación-agitación de 50 l de capacidad, y se inoculó con la disolución de cultivo obtenida previamente por el cultivo de siembra (primera fase), seguido por el cultivo de siembra (segunda fase) durante 2 días en el que la velocidad rotacional de agitación fue de 200 rpm, la temperatura fue de 28°C y la presión interna del recipiente fue de 150 kPa.

A continuación, se inoculó un medio de cultivo que contiene 4% de harina de soja desgrasada, 1,8% de glucosa, 0,3% de KH_2PO_4 , 0,1% de Na_2SO_4 , 0,05% de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,05% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 0,1% de aceite de oliva, y que tiene un pH de 6,1 con 0,5% de la disolución de cultivo de siembra (segunda fase). Se inició el cultivo principal con 4000 l (cantidad de líquido) del medio de cultivo.

Se inició el cultivo cuando la temperatura fue de 24°C, la presión interna fue de 200 kPa, la cantidad de aireación fue de 52 m³/h (la velocidad de flujo de aire (=Vs) fue de 0,0057 m/s) y la potencia requerida para la agitación por cantidad de líquido de cultivo (=P/V) fue de 30 W/m³. Los valores de los parámetros en el momento del inicio del cultivo se calcularon tal como sigue.

(Expresión 13)

$$(P/V)^{0,95}: 25 [(W/m^3)^{0,95}]$$

$$Vs^{0,67}: 0,0313 [(m/s)^{0,67}]$$

$$KLA (=P/V)^{0,95} Vs^{0,67}: 0,782 [(W/m^3)^{0,95} (m/s)^{0,67}]$$

Se inició el cultivo en estas condiciones. La potencia de agitación se cambió en la hora 22 de cultivo tras el inicio del cultivo, y la cantidad de aireación y la velocidad rotacional de agitación aumentaron gradualmente hasta que la cantidad de aireación máxima fue de 240 m³/h (la velocidad de flujo de aire (=Vs): 0,0262 m/s) y la potencia de agitación máxima (=P/V) fue de 1098 W/m³, hacia la hora 48 del cultivo. Los valores de los parámetros en el nivel de aireación-agitación alto se calcularon tal como sigue.

(Expresión 14)

$$(P/V)^{0,95}: 773,8 [(W/m^3)^{0,95}]$$

$$Vs^{0,67}: 0,0871 [(m/s)^{0,67}]$$

$$KLA (=P/V)^{0,95} Vs^{0,67}: 67,4 [(W/m^3)^{0,95} (m/s)^{0,67}]$$

Se realizó el cultivo principal durante 376 horas mientras se añadía glucosa en algún/algunos punto(s) durante el cultivo. Como resultado, la concentración de ácido eicosatrienoico producido fue de 6,0 g/l al final del cultivo.

Uso industrial

Puede producirse de manera eficaz y estable al menos uno cualquiera de ácido araquidónico, que desempeña particularmente un papel importante como nutriente para lactantes o un compuesto (por ejemplo, grasas, aceites, etc.) que contiene ácido araquidónico como ácido graso constituyente. Por tanto, la presente invención es útil para la producción de bebidas, alimentos con nutrientes terapéuticos, alimentación, productos farmacéuticos y similares que contienen estos materiales.

REIVINDICACIONES

1. Método de cultivo de un hongo, que produce al menos uno cualquiera de un ácido graso altamente insaturado o un compuesto que contiene un ácido graso altamente insaturado como ácido graso constituyente en un medio de cultivo que contiene al menos una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno, usando un dispositivo de cultivo de aireación-agitación que incluye un recipiente de cultivo que tiene una paleta de agitación, en el que la razón (d/D) del diámetro de la paleta de agitación ($=d$) con respecto al diámetro del recipiente de cultivo ($=D$) es de 0,3 a 0,6, pudiendo el dispositivo de cultivo ajustar y controlar una potencia de agitación y una cantidad de aireación, comprendiendo el método las etapas de:
5
10
15
después de pasar el tiempo predeterminado, ajustar y controlar al menos una cualquiera de la cantidad de aireación máxima y una potencia máxima requeridas para la agitación a un intervalo tal que $KLA(=(P/V)^{0,95}Vs^{0,67})$ es de 59 o más, siempre que el parámetro de velocidad de flujo de aire $Vs^{0,67}$ sea de 0,075 o más, y siempre que el parámetro de potencia de agitación $(P/V)^{0,95}$ sea de 203 o más, en el que P representa la potencia requerida para la agitación (W), V representa la cantidad de líquido (m^3) y Vs representa la velocidad de flujo de aire (m/s).
2. Método según la reivindicación 1, en el que el ácido graso altamente insaturado es ácido araquidónico.
3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el hongo es del género *Mortierella*, subgénero *Mortierella*.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el tiempo predeterminado es preferiblemente de 12 a 24 horas.
20
5. Método de preparación de un ácido graso altamente insaturado que comprende la etapa de extraer/separar el ácido graso altamente insaturado a partir de un hongo cultivado mediante el método de cultivo de hongos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Método de preparación de un compuesto que contiene un ácido graso altamente insaturado como ácido graso constituyente, que comprende la etapa de extraer/separar el compuesto que contiene un ácido graso altamente insaturado a partir de un hongo cultivado mediante el método de cultivo de hongos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
25

FIG.1

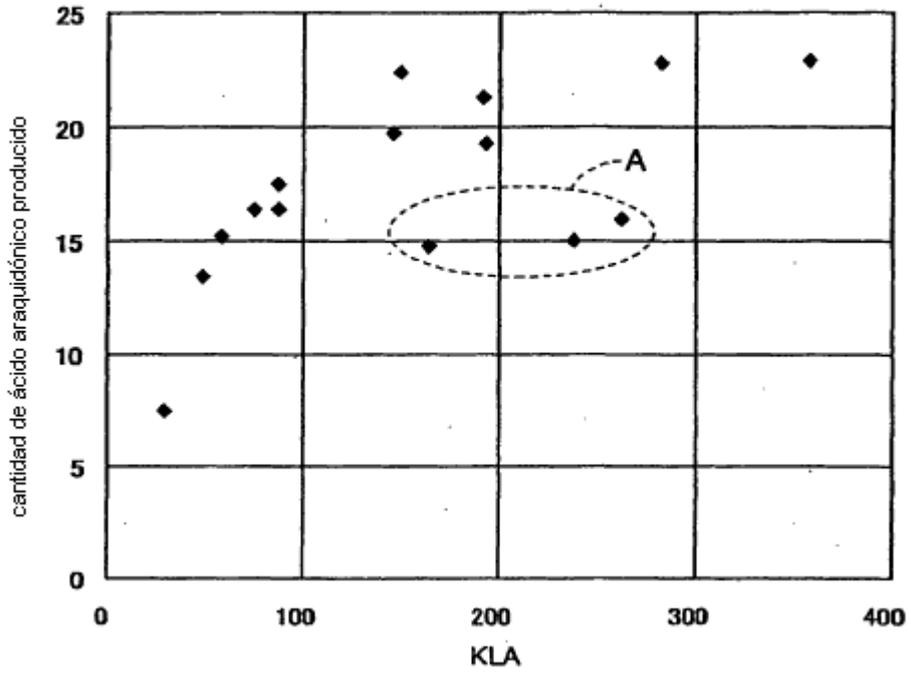


FIG.2

