

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 446 982**

51 Int. Cl.:

C12P 7/64 (2006.01)

C12N 1/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.12.1997** **E 97950433 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2014** **EP 0960943**

54 Título: **Medios para cultivar microorganismos y método para producir ácidos grasos insaturados o lípidos que los contienen**

30 Prioridad:

27.12.1996 JP 34954196

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.03.2014

73 Titular/es:

SUNTORY HOLDINGS LIMITED (100.0%)
1-40, Dojimahama 2-chome, Kita-ku
Osaka-shi Osaka 530-8203, JP

72 Inventor/es:

HIGASHIYAMA, KENICHI;
YAGUCHI, TOSHIAKI;
AKIMOTO, KENGO y
SHIMIZU, SAKAYU

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 446 982 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

Medios para cultivar microorganismos y método para producir ácidos grasos insaturados o lípidos que los contienen

Campo técnico

La presente invención se refiere al uso de un medio de cultivo para cultivar un microorganismo, en un procedimiento para producir un lípido que contiene ácidos grasos insaturados que se puede obtener cultivando un microorganismo que pertenece al género Mortierella capaz de producir ácidos grasos insaturados en dicho medio.

Antecedentes de la técnica

Se dice que el ácido araquidónico, el ácido dihomo- γ -linolénico, el ácido eicosapentaenoico, el ácido de Mead y similares son precursores de prostaglandinas, tromboxanos, prostaciclina, leucotrienos y similares, que tienen potentes y diversas actividades biológicas, y por lo tanto están atrayendo mucha atención en los últimos años. Por ejemplo, se ha hecho un rápido progreso en el estudio del ácido araquidónico, como del ácido docosahexaenoico (DHA) como un ingrediente esencial, especialmente para el crecimiento de los niños; Lanting et al. han llevado a cabo un estudio de seguimiento sobre niños criados con leche materna y los criados con fórmula para lactantes durante tres semanas o más después del nacimiento hasta que crecieron hasta la edad de nueve años en cuanto a la incidencia de trastornos menores en los nervios cerebrales en base a sus aspectos conductuales, etc., y han reportado que la incidencia de trastornos cerebrales en los niños criados con fórmula para lactantes es dos veces más alta que la de los niños criados con leche materna (LANCET, vol. 344, 1319-1322 (1994)).

Se ha especulado que este impactante resultado es debido a la posibilidad de que tales ácidos grasos insaturados, como DHA y ácido araquidónico, que están presentes en la leche materna pero no en la fórmula para lactantes, pueden estar asociados con el desarrollo del cerebro. Desde entonces, han aparecido muchos informes que sugieren la asociación de ácidos grasos insaturados con el desarrollo del cerebro y la retina en los niños, lo que está atrayendo la atención como tema más reciente en el campo de la nutrición para prematuros y recién nacidos.

Estos ácidos grasos insaturados aparecen ampliamente en el reino animal: por ejemplo, el ácido araquidónico ha sido aislado de un lípido que se extrajo de la glándula adrenal o el hígado de animales. El contenido de ácidos grasos insaturados en los mismos, sin embargo, es bajo, y fue insuficiente para su suministro a gran escala, y por lo tanto se han ideado diversos métodos para obtener ácidos grasos insaturados cultivando diversos microorganismos. Entre otros, se sabe que los microorganismos que pertenecen al género Mortierella producen ácidos grasos insaturados tales como ácido araquidónico, ácido dihomo- γ -linolénico, ácido eicosapentaenoico, ácido de Mead y similares, y por lo tanto se han desarrollado métodos que producen dichos ácidos grasos insaturados por el método de fermentación usando estos microorganismos (documentos JP-A-63(1998)-44891 y EP-A-0276541, JP-A-63(1998)-12290 y EP-A-0223960, JP-A-63(1998)-14696 y JP-A-63(1988)-14697, correspondientes a EP-A-0252716).

También se conoce un método para producir ácido de Mead usando una cepa mutante en la que la actividad desaturante de $\Delta 12$ ha sido reducida o hecha defectiva, que se puede obtener sometiendo un microorganismo del género Mortierella a un tratamiento de mutación (documentos JP-A-5(1993)-91888 y EP-A-0535939).

Además, también se conoce un método para producir ácido dihomo- γ -linolénico usando una cepa mutante en la que la actividad desaturante de $\Delta 5$ ha sido reducida o hecha defectiva, que se puede obtener sometiendo un microorganismo del género Mortierella a un tratamiento de mutación (documentos JP-A-5(1993)-91887 y EP-A-0535940).

Sin embargo, cuando se lleva a cabo una producción por fermentación en un medio líquido usando un hongo filamentoso como el género Mortierella, el crecimiento celular da como resultado a menudo el aumento de la viscosidad del medio de cultivo líquido y la consiguiente reducción del suministro de oxígeno. Aunque un método (documento JP-A-6(1994)-153970) de regulación del oxígeno disuelto, desarrollado para vencer los inconvenientes anteriores, ha jugado un importante papel en la mejora de la productividad, no es suficiente para lograr una alta productividad que sea económicamente excelente a escala industrial. Por ello, es imperativo el desarrollo extensivo de técnicas de cultivo que incluyan la búsqueda de medios de cultivo y nutrientes traza más baratos, y un método para regular la morfología micelial para mejorar la fluidez del medio de cultivo líquido.

Como estrategia para tal desarrollo tecnológico, se está investigando el efecto de añadir sales como nutrientes traza sobre la morfología micelial. Hay diversos informes sobre el efecto de añadir iones tales como potasio, sodio, calcio, magnesio y ácido fosfórico entre otros (solicitud de patente internacional WO96/21037, documentos JP-A-8(1996)-214893 y EP-A-0726321, Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol. 39, p. 450 (1993), Biotechnology Lett., Vol. 12, No. 6, p. 455 (1990), Yukagaku (Oil Chemistry) Vol. 37, No. 3, p. 241 (1989), Yukagaku (Oil Chemistry) Vol. 42, No. 11, p. 893 (1993)). Por otra parte, sin embargo, estos informes no investigaron el efecto de aumentar de manera más agresiva la productividad de ácidos grasos insaturados añadiendo estos iones principales a concentraciones de 0,5 mM o superiores, excediendo el concepto de ser suplementos nutricionales, ni investigaron siquiera los efectos que tiene el equilibrio de los iones añadidos sobre la morfología micelial y las composiciones de los lípidos. Se desea, por lo tanto, optimizar el método de añadir iones.

El documento EP-A-0125764 describe un cultivo de *Mortierella* productor de lípidos, específicamente *M. isabellina*, *M. vinacea*, *M. ramanniana* var. *anglispora* o *M. nana*, en un medio que contiene por litro de agua 2 g de KH_2PO_4 , 0,3 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g de NaCl , 0,2 g de extracto de malta, 0,2 g de extracto de lavadura y 0,1 g de peptona. La fuente de carbono fue glucosa o melazas, las fuentes de nitrógeno alternativas sulfato de amonio o urea.

- 5 El documento EP-A-0726321, mencionado anteriormente, describe producir aceite que contiene ARA cultivando *M. schmuckeri*, del que se dice que toma una morfología filamentosa dispersa durante el cultivo (distinta a gránulos) mejorando así el crecimiento y la productividad. El medio de cultivo usa preferiblemente una fuente de nitrógeno compleja tal como licor de maíz fermentado, hidrolizado de proteínas o biomasa, tona de soja, harina de soja, harina de pescado o de carne, peptona, triptona, extracto de levadura, levadura o suero de leche. Se pueden añadir sales inorgánicas y metales traza, pero se recomienda una baja concentración de magnesio para mejorar la producción. Un ejemplo usa medio M-3, que comprende 12 g/l de harina de soja, 0,1 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g/l de CaCO_3 , aditivos de metales traza, 1 ml/l de mezcla de vitaminas, 2 g/l de KH_2PO_4 y 43,8 g/l de glucosa.

- 10 La solicitud de patente internacional WO96/21037, mencionada anteriormente, describe producir aceite que contiene ARA cultivando *M. alpina*. Algunos ejemplos usan glucosa y extracto de levadura sin aditivos minerales. Se advirtió la formación gradual de gránulos de biomasa después de la inoculación. Otros ejemplos suplementan con sales de Fe, Zn y Cu, a veces KH_2PO_4 también. El medio del Ejemplo 7 fue 80 g/l de dextrosa, 16 g/l de harina de soja, 30 mg/l de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1,5 mg/l de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 mg/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y vitaminas. Se añadieron más tarde 2 g/l de KH_2PO_4 .

- 20 Kendrick y Routledge, en *LIPIDS* vol. 27 no. 1 (1992) págs. 15-20, cultivaron diversos hongos que incluían *Mortierella alpina*-peyron CBS 696.70 en un medio de 30 g/l de glucosa, 3,3 g/l de tartrato de amonio, 7,0 g/l de KH_2PO_4 , 2 g/l de Na_2HPO_4 , 1,5 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,5 g/l de extracto de levadura, 0,1 g/l de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y cantidades más pequeñas de sales de Fe, Zn, Cu, Co y Mn.

- 25 Bajpai et al, en *J. Ind. Microbiol.* 9(1992) págs. 11-18 describieron el cultivo de *M. elongata* para producir aceite que contiene EPA. El medio fue aceite de linaza o glucosa como fuente de carbono, extracto de levadura a 0,5 g/l, 2,4 g/l de KH_2PO_4 , 1 g/l de KNO_3 , 0,1 g/l de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y cantidades más pequeñas de sales de Fe, Zn y Cu. El mismo medio fue descrito por Hansson y Dostálek en *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1988) 28 págs. 240-246.

- 30 Stredanská y Sajbidor, en *Acta Biotechnol.* 13(1993) 2 págs. 185-191 describen el cultivo de *M. alpina* para producir ARA. El medio comprendía 1,3 g/l de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g/l de KCl , 0,5 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0,01 g/l de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Las fuentes de nitrógeno usadas fueron extracto de levadura, NaNO_3 , urea, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, hidrolizado de caseína, peptona y L-lisina en diversas cantidades. Glucosa, almidón y dextrina fueron fuentes de carbono exitosas.

- 35 Por tanto, es un objeto en la presente memoria proporcionar un procedimiento para producir un lípido que contiene ácidos grasos insaturados mediante una fermentación de microorganismos que pertenecen al género Mortierella, comprendiendo dicho procedimiento añadir sales al medio de cultivo para mejorar la productividad de ácidos grasos insaturados, más específicamente todo el crecimiento microbiano, la acumulación de ácidos grasos insaturados y la acumulación de lípidos totales, y lograr de este modo un suministro económico y estable del lípido que contiene ácidos grasos insaturados. Es también un objeto en la presente memoria usar un medio de cultivo para cultivar un microorganismo que tenga la ventaja de producir ácidos grasos insaturados en altos rendimientos y que sea barato.

- 40 Para solucionar los problemas anteriores, los presentes inventores han llevado a cabo un completo estudio relacionado con los efectos de añadir sales a un medio de cultivo con respecto no sólo al rendimiento en ácidos grasos insaturados sino también a los cambios en la morfología micelial y composición de los lípidos. Como resultado, los inventores han encontrado que es muy eficaz añadir todos los iones de potasio, sodio, calcio, magnesio y fósforo en concentraciones definidas de una manera bien equilibrada, y de este modo han completado la presente invención.

- 45 Como se expone en la reivindicación 1, la presente invención proporciona el uso, en un procedimiento para producir ácido graso insaturado o lípido que contiene tal ácido graso que comprende cultivar un microorganismo que pertenece al género Mortierella en un medio que contiene una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno, de un dicho medio que contiene iones fosfato, iones potasio, iones sodio, iones magnesio e iones calcio para controlar la morfología micelial del microorganismo *Mortierella* cultivado para que sea una mezcla de pulpa y gránulos, y en donde:

- 50 (i) la fuente de nitrógeno contiene una o más fuentes de nitrógeno derivadas de sojas, iones fosfato en el intervalo de 5 a 60 mM, iones potasio en el intervalo de 5 a 60 mM, iones sodio en el intervalo de 2 a 50 mM, iones magnesio en el intervalo de 0,5 a 9 mM e iones calcio en el intervalo de 0,5 a 12 mM, o

- 55 (ii) el medio contiene iones fosfato en el intervalo de 10 a 45 mM, iones potasio en el intervalo de 10 a 45 mM, iones sodio en el intervalo de 5 a 40 mM, iones magnesio en el intervalo de 1 a 6 mM e iones calcio en el intervalo de 1 a 9 mM.

Por tanto, la presente invención usa un medio de cultivo para cultivar un microorganismo en el que los iones fosfato,

iones potasio, iones sodio, iones magnesio e iones calcio están en el intervalo de 5 a 60 mM, 5 a 60 mM, 2 a 50 mM, 0,5 a 9 mM y 0,5 a 12 mM, respectivamente, y un procedimiento que tiene una productividad aumentada de producción de ácidos grasos insaturados y un lípido que contiene los mismos cultivando en dicho medio un hongo filamentoso, en particular un microorganismo que pertenece al género Mortierella.

5 El término "ácidos grasos insaturados" como se emplea en la presente memoria, se refiere a los ácidos grasos que tienen 16 o más átomos de carbono y uno o más dobles enlaces. Entre estos, los que tienen 18 o más átomos de carbono y dos o más dobles enlaces se llaman generalmente ácidos grasos altamente insaturados, que por ejemplo incluyen ácido γ -linolénico, ácido dihomo- γ -linolénico, ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico, ácido de Mead, ácido 6,9-octadecadienoico, ácido 8,11-eicosadienoico y similares.

10 El medio de cultivo para cultivar un microorganismo usado en la presente invención contiene iones fosfato, iones potasio, iones sodio, iones magnesio e iones calcio en el intervalo de 5 a 60 mM, 5 a 60 mM, 2 a 50 mM, 0,5 a 9 mM y 0,5 a 12 mM, respectivamente, preferiblemente en el intervalo de 10 a 45 mM, 10 a 45 mM, 5 a 40 mM, 1 a 6 mM y 1 a 9 mM, respectivamente, y se usa para cultivar un microorganismo, específicamente un hongo filamentoso que pertenece al género Mortierella y que es capaz de producir ácidos grasos insaturados. Los ácidos grasos
15 insaturados se pueden obtener en alto rendimiento a partir de cultivo usando el medio de cultivo propuesto en la presente memoria. El medio de cultivo contiene, según sea apropiado, ingredientes tales como la fuente de carbono, fuente de nitrógeno, fuente de nutrientes traza, etc., además de iones fosfato, iones potasio, iones sodio, iones magnesio e iones calcio, dependiendo del microorganismo a ser usado.

En la presente invención, los microorganismos usados en la producción de un lípido que contiene ácidos grasos
20 insaturados pueden ser cualquier organismo que pertenece al género Mortierella. Por ejemplo, estos microorganismos incluyen cepas microbianas tales como las que se describen en MYCOTAXON, Vol. XLIV, No. 2, págs. 257-265 (1992), y más específicamente incluyen microorganismos que pertenecen al subgénero Mortierella tales como Mortierella elongata IFO 8570, Mortierella exigua IFO 8571, Mortierella hygrophila IFO 5941, Mortierella alpina IFO 8568, ATCC 16266, ATCC 32221, ATCC 42430, CBS 219.35, CBS 224.37, CBS 250.53, CBS 343.66,
25 CBS 527.72, CBS 528.72, CBS 529.72, CBS 608.70, y CBS 754.68; y microorganismos que pertenecen al subgénero Micromucor tales como Mortierella isabellina CBS 194.28, IFO 6336, IFO 7824, IFO 7873, IFO 7874, IFO 8286, IFO 8308, IFO 7884, Mortierella nana IFO 8190, Mortierella ramanniana IFO 5426, IFO 8186, CBS 112.08, CBS 212.72, IFO 7825, IFO 8184, IFO 8185, IFO 8287, y Mortierella vinacea CBS 236.82.

Todas estas cepas microbianas están disponibles sin limitación en el Institute for Fermentation, Osaka, en Japón, el
30 American Type Culture Collection (ATCC), en los Estados Unidos, y el CentralBureau voor Schimmelcultures (CBS), en los Países Bajos. Además, se puede usar la cepa microbiana Mortierella elongata SAM 0219 (FERM P-8703) (FERM BP-1239) que fue aislada del suelo por los inventores. Estas cepas microbianas que pertenecen a cultivos tipo y aislantes microbianos aislados de la naturaleza se pueden usar tal como son, y también se pueden usar
35 mutantes espontáneos que fueron obtenidos efectuando un crecimiento y/o aislamiento una vez o más, y que tienen una propiedad diferente de la cepa microbiana original.

Los microorganismos para uso en la presente invención pueden incluir los mutantes y recombinantes de los organismos que pertenecen al género Mortierella (cepa de tipo salvaje), esto es, los organismos destinados y diseñados para producir una cantidad aumentada de ácidos grasos insaturados específicos y/o todos en un lípido o una cantidad aumentada de lípidos totales, o una cantidad aumentada de ambos en comparación con una cantidad
40 producida por la cepa de tipo salvaje original cuando se cultiva en el mismo medio. Por ejemplo, como mutante que fue diseñado para producir una cantidad aumentada de ácidos grasos insaturados específicos, se puede mencionar Mortierella alpina SAM 1861 (FERM BP-3590) en el que la actividad desaturante de $\Delta 12$ ha sido hecha defectiva, y Mortierella alpina SAM 1860 (FERM BP-3589) en el que la actividad desaturante de $\Delta 5$ ha sido hecha defectiva.

Además, también se incluye un microorganismo que fue diseñado para producir ácidos grasos insaturados en una
45 cantidad igual a la de la cepa de tipo salvaje correspondiente usando un sustrato que tiene un mejor rendimiento de coste de una manera eficaz.

Los microorganismos que pertenecen al género Mortierella anterior pueden ser cultivados según un método convencional, excepto que las concentraciones de iones fosfato, iones potasio, iones sodio, iones magnesio e iones calcio en el medio de cultivo se ajustan para que estén en su intervalo específico. Por ejemplo, los microorganismos
50 mencionados anteriormente en la forma de esporas, hifas, o precultivo líquido obtenido cultivando de antemano se inoculan y cultivan sobre un medio de cultivo líquido o un medio de cultivo sólido. Como fuente de carbono, se puede usar cualquiera de los comúnmente usados, glucosa, fructosa, xilosa, sacarosa, maltosa, almidón soluble, melazas, glicerol, manitol, ácido cítrico, almidón de maíz y similares, y en particular se prefieren glucosa, maltosa, fructosa, almidón de maíz, glicerol y ácido cítrico.

55 Como fuente de nitrógeno, se pueden usar fuentes de nitrógeno orgánicas tales como peptona, extracto de levadura, extracto de malta, extracto de carne, ácido casamínico, licor de maíz fermentado, urea y similares, y fuentes de nitrógeno inorgánicas tales como nitrato de amonio, sulfato de amonio y similares. En particular, usando una o más fuentes de nitrógeno obtenidas de sojas, solas o en combinación con las fuentes de nitrógeno anteriores, se puede obtener un efecto sinérgico más preferido de la adición de sales.

Además, como fuente de nitrógeno derivada de sojas, se pueden usar, solas o bien en combinación, sojas desgrasadas o sojas desgrasadas que fueron sometidas a un tratamiento con calor; un tratamiento con ácidos; un tratamiento con álcalis; un tratamiento con enzimas; una modificación química; o desnaturalización y/o renaturalización usando un tratamiento químico y/o físico que comprende cualquiera de los tratamientos anteriores; la retirada de algunos de los componentes con agua y/o un disolvente orgánico; la retirada de algunos de los componentes por filtración y/o centrifugación; congelación; disrupción; secado; y/o tamizado y similares; o sojas no desgrasadas que fueron sometidas al mismo tratamiento que anteriormente. En general, se pueden mencionar sojas, sojas desgrasadas, copos de soja, proteínas de soja comestibles, tofu encurtido de soja (okara), leche de soja, harina de soja tostada (kinako) y similares. Preferiblemente, se usan las sojas desgrasadas que fueron sometidas a un tratamiento con calor, y más preferiblemente las sojas desgrasadas que fueron sometidas a un tratamiento con calor a aproximadamente 70-90 °C seguido de la retirada de los componentes solubles en etanol.

Además de iones fosfato, iones potasio, iones sodio, iones magnesio e iones calcio, se pueden usar, cuando se desee, como fuente de nutriente traza, iones metálicos tales como iones de hierro, iones de cobre, iones de cinc, iones de manganeso, iones de níquel e iones de cobalto, y vitaminas y similares. Para aumentar el rendimiento de ácidos grasos insaturados, se puede usar, como precursores a ácidos grasos insaturados, hidrocarburos tales como hexadecano o octadecano; ácidos grasos tales como ácido oleico o ácido linoleico o sales de los mismos, o ésteres de ácidos grasos tales como éster etílico, éster de ácidos grasos de glicerol, y éster de ácidos grasos de sorbitán; o se pueden usar lípidos tales como aceite de oliva, aceite de soja, aceite de colza, aceite de semilla de algodón o aceite de coco, solos o bien en combinación. La cantidad del sustrato añadida es 0,001 a 10%, preferiblemente 0,5 a 10%. Además el cultivo se puede llevar a cabo usando uno de estos sustratos como única fuente de carbono.

En el medio de cultivo usado en la invención, los iones fosfato están presentes en el intervalo de 5 a 60 mM, los iones potasio en el intervalo de 5 a 60 mM, los iones sodio en el intervalo de 2 a 50 mM, los iones magnesio en el intervalo de 0,5 a 9 mM, y los iones calcio en el intervalo de 0,5 a 12 mM, y preferiblemente, en el medio de cultivo, los iones fosfato están en el intervalo de 10 a 45 mM, los iones potasio están en el intervalo de 10 a 45 mM, los iones sodio están en el intervalo de 5 a 40 mM, los iones magnesio están en el intervalo de 1 a 6 mM, y los iones calcio están en el intervalo de 1 a 9 mM.

Estos iones se pueden preparar añadiendo al medio de cultivo sales como hidrogenofosfato de dipotasio, dihidrogenofosfato de potasio, hidrogenofosfato de disodio, y/o dihidrogenofosfato de sodio para los iones fosfato, sales tales como hidrogenofosfato de dipotasio, dihidrogenofosfato de potasio y/o cloruro de potasio para los iones potasio, sales tales como hidrogenofosfato de disodio, dihidrogenofosfato de sodio, cloruro de sodio y/o sulfato de sodio para los iones sodio, sales tales como cloruro de magnesio y/o sulfato de magnesio para los iones magnesio, y sales tales como cloruro de calcio y/o carbonato de calcio para los iones calcio. Sin embargo, estos compuestos no son limitantes, y se puede usar cualquier compuesto, siempre y cuando no inhiba el crecimiento de los microorganismos.

Estas sales pueden ser hidratos o bien anhídridos. Además, las sales descritas anteriormente se combinan, según sea apropiado, para obtener las concentraciones de iones en los intervalos propuestos en la presente memoria. Por ejemplo, mezclando ciertas cantidades de 4 compuestos tales como dihidrogenofosfato de potasio (KH_2PO_4), sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4), cloruro de magnesio hexahidrato ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) y cloruro de calcio dihidrato ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), se pueden preparar ciertas concentraciones de iones para la presente invención.

Según los hallazgos de los autores de la invención, la adición de tales sales aumenta sustancialmente el rendimiento en ácidos grasos insaturados. Además, aunque sus efectos sobre la morfología micelial en el cultivo líquido no pueden ser especificados debido a los efectos de componentes distintos a las sales del medio y de las cepas microbianas, una cantidad aumentada del fosfato añadido da como resultado una proporción aumentada de micelios en la forma de pulpa, y una cantidad aumentada de magnesio añadido da como resultado una proporción aumentada de micelios en la forma de gránulos. El crecimiento en la forma de pulpa aumenta la viscosidad del medio de cultivo líquido y reduce la fluidez y la concentración de oxígeno disuelto, causando de este modo una reducción en el rendimiento.

El crecimiento en la forma de gránulos, por el contrario, apenas da como resultado un aumento de la viscosidad, y de este modo se mantiene una alta fluidez, pero la pared del gránulo proporciona un factor limitante de la velocidad del suministro de oxígeno y causa una reducción en el rendimiento. Los autores de la invención han encontrado, sin embargo, que añadiendo dichos iones a ciertas concentraciones de una manera bien equilibrada, la formación excesiva de pulpa y la formación excesiva de gránulos pueden ser controladas, y el estado mixto de la pulpa y los gránulos puede ser mantenido. Esta técnica ha permitido que sea fácil controlar la morfología de los micelios y obtener rendimientos muy altos.

Los lípidos que contienen ácidos grasos insaturados obtenidos como se describió anteriormente son mayoritariamente triglicéridos, y el porcentaje de fosfolípido aumenta con un aumento en la cantidad de fosfato añadido al medio. Los autores de la invención han descubierto, sin embargo, que añadiendo iones potasio, iones sodio, iones magnesio, iones calcio además de iones fosfato de una manera bien equilibrada, el porcentaje de los triglicéridos en los lípidos microbianos puede ser mantenido a 90% o superior. Cuando el lípido diana son triglicéridos, se puede mantener una alta recuperación mezclando las sales añadidas de una manera bien

equilibrada dentro de los intervalos especificados en la presente memoria.

Las anteriores fuente de carbono, fuente de nitrógeno, y otros componentes del medio se pueden añadir al medio de cultivo antes de cultivar y/o al medio de cultivo líquido durante el cultivo. Estos componentes del medio de cultivo se pueden añadir de una vez o secuencialmente, o en varias porciones a lo largo del tiempo. Estos componentes del medio de cultivo pueden ser esterilizados y añadidos solos o después de mezclarlos, y el método de esterilización o el orden de adición no están limitados particularmente. Preferiblemente, la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno se esterilizan por separado, y las sales se añaden hacia el final del crecimiento logarítmico, más preferiblemente antes de la mitad del crecimiento logarítmico. Las concentraciones de los otros componentes del medio de cultivo que no afectan a las concentraciones de iones fosfato, iones potasio, iones sodio, iones magnesio e iones calcio no están limitadas, siempre y cuando no inhiban el crecimiento del microorganismo.

En la práctica, la cantidad total de la fuente de carbono a ser añadida es en general 0,1 a 40% en peso, preferiblemente 1 a 25% en peso, la cantidad total de la fuente de nitrógeno a ser añadida es 0,01 a 10% en peso, preferiblemente 0,1 a 10% en peso, y más preferiblemente la cantidad inicial de la fuente de carbono a ser añadida es 1 a 5% en peso y la de la fuente de nitrógeno a ser añadida es 0,1 a 6% en peso, y durante el cultivo la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno, más preferiblemente la fuente de carbono sola, se añaden y se cultiva. La temperatura de cultivo es 5 a 40°C, preferiblemente 20 a 30°C. Además, también es posible producir ácidos grasos insaturados cultivando las células microbianas a 20 a 30°C seguido de cultivo a 5 a 20°C para producir ácidos grasos insaturados.

El pH del medio de cultivo es 4 a 10, preferiblemente 5 a 8, y se lleva a cabo un cultivo con aireación y agitación, un cultivo de remoción o un cultivo estacionario. El cultivo se continúa generalmente durante 2 a 20 días. Cultivando de esta manera, se forma un lípido que contiene ácidos grasos insaturados y se acumula en las células microbianas. En la producción de ácidos grasos insaturados, se prefiere el cultivo con aireación y agitación con un medio de cultivo líquido.

El lípido deseado se puede obtener por un método convencional a partir del medio de cultivo líquido en mitad de la producción del lípido por cultivo o a partir del medio de cultivo líquido esterilizado del mismo, o a partir del medio de cultivo líquido después de completarse el cultivo o el medio de cultivo líquido esterilizado del mismo, o de las células microbianas cultivadas recogidas de los cultivos respectivos o los productos secados de las mismas. A partir de las células microbianas cultivadas, se puede obtener el lípido deseado, por ejemplo, por el siguiente método.

Después de que ha terminado el cultivo, las células microbianas cultivadas se pueden obtener del medio de cultivo líquido por un método usado convencionalmente de separación del sólido del líquido tal como centrifugación y/o filtración. Las células microbianas cultivadas se lavan preferiblemente con agua, se rompen y se secan. El secado se efectúa por liofilización, secado al aire, y similares. Las células microbianas secas son sometidas a extracción con un disolvente orgánico, preferiblemente bajo una corriente de nitrógeno. Como disolvente orgánico, se puede usar éter, hexano, metanol, etanol, cloroformo, diclorometano, éter de petróleo y similares, y también se pueden obtener resultados satisfactorios mediante una extracción alterna con metanol y éter de petróleo o un disolvente de una sola capa que comprende cloroformo-metanol-agua, y preferiblemente extraído con hexano.

Evaporando el disolvente orgánico del extracto a presión reducida, se puede obtener una alta concentración de un lípido que contiene ácidos grasos insaturados. El método anterior puede ser reemplazado por extracción usando las células microbianas húmedas. En este caso, se usa un disolvente miscible con el agua tal como metanol o etanol, o una mezcla de estos disolventes con agua y/o otros disolventes. Los otros procedimientos son los mismos que los descritos anteriormente. Los triglicéridos que contienen ácidos grasos insaturados del lípido que contiene ácidos grasos insaturados recogido del cultivo pueden ser separados y purificados según un medio convencional, tal como extracción con disolventes, la retirada del disolvente, seguido por desacidificación, decoloración, desodorización, desgomado, o centrifugación refrigerada o similares.

Ejemplos

La presente invención será explicada en más detalle con referencia a los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Se usó *Mortierella alpina* CBS 754.68 como microorganismo productor de ácido araquidónico. Cada uno de cuatro medios de cultivo que contenían 2% de glucosa, 0,1% de aceite de soja, y la fuente de nitrógeno y componentes salinos descritos en la Tabla 1 en 5 litros se preparó en un fermentador de 10 litros, y el pH inicial se ajustó a 6,0. Se inocularon cincuenta ml del precultivo líquido y se llevó a cabo un cultivo con aireación/agitación durante 8 días a 28°C, una tasa de aireación de 1,0 vvm y una velocidad de agitación de 300 rpm. La concentración de glucosa fue mantenida a entre 1% y 2% por un método de alimentación discontinua hasta el día 4, y a entre 0,5% y 1% después del mismo.

Como resultado del cultivo, se encontró que la cantidad de araquidónico producido aumento en 1,35 veces cuando se añadieron todos los 5 iones al medio de extracto de levadura, y en 1,68 veces cuando se añadieron a proteína de soja, confirmando la eficacia de la adición de sales. Cuando se añadió hidrogenofosfato de potasio solo, no se

advirtió aumento en la cantidad de ácido araquidónico producido.

Además de la cantidad de ácido araquidónico producido, la cantidad de cada componente fue cuantificada usando el analizador de TLC/FID (latroscan, fabricado por latron) después de que se extrajo el lípido con hexano de las células microbianas obtenidas seguido del fraccionamiento del lípido por el método TLC bajo una condición de separación de hexano : éter dietílico : ácido fórmico = 42 : 28 : 0,3.

Como resultado, se encontró que la adición de hidrogenofosfato de potasio solo dio como resultado un aumento en el porcentaje de fosfolípidos en el lípido de las células microbianas extraídas con hexano, y, por otra parte, la adición de todos los cuatro tipos de sales, incluyendo hidrogenofosfato de potasio, produjo la composición de lípido similar a la obtenida sin adición de sales, confirmando de este modo que la adición de todos los iones de una manera bien equilibrada da lípidos con un alto contenido en triglicéridos cuando el producto deseado es triglicérido.

Tabla 1

Medio de cultivo	Extracto de levadura 1%	Proteína de soja 1,5%	Extracto de levadura 1% KH ₂ PO ₄ 0,3% (22 mM) MgCl ₂ ·6H ₂ O 0,05% (2,5 mM) Na ₂ SO ₄ 0,1% (7,0 mM) CaCl ₂ ·2H ₂ O 0,05% (3,4 mM)	Proteína de soja 1,5% KH ₂ PO ₄ 0,3% (22 mM) MgCl ₂ ·6H ₂ O 0,05% (2,5 mM) Na ₂ SO ₄ 0,1% (7,0 mM) CaCl ₂ ·2H ₂ O 0,05% (3,4 mM)	Proteína de soja 1,5% KH ₂ PO ₄ 0,3% (22 mM)
Cantidad de ácido araquidónico producido	2,28 g/l	1,93 g/l	3,07 g/l	3,24 g/l	2,00 g/l
Cantidad de lípido total producido	6,57 g/l	5,74 g/l	8,82 g/l	8,95 g/l	5,83 g/l
Concentración de células microbianas secas	17,3 g/l	15,7 g/l	19,3 g/l	22,0 g/l	16,0 g/l
Contenido de triglicérido	97,2%	97,4%	97,0%	96,0%	88,3%
Contenido de fosfolípido	1,2%	1,2%	1,4%	1,2%	9,5%

Extracto de levadura: fabricado por Universal Foods, TASTONE154AG

Proteína de soja: nombre comercial; Esusan Meat, producto de Ajinomoto Co. Ltd.

Ejemplo 2

Se usó *Mortierella alpina* CBS 754.68 como microorganismo productor de ácido araquidónico. Cada uno de cuatro medios de cultivo que contenían 2% de glucosa, 1,5% de harina de soja tostada (kinako), 0,1% de aceite de soja y las sales mostradas en la Tabla 2 en 25 litros se preparó en un fermentador de 50 litros, y el pH inicial se ajustó a 6,2. Se inocularon cincuenta ml del precultivo líquido en el mismo y después se sometió a un cultivo con aireación/agitación a 28°C, una tasa de aireación de 1,0 vvm, una velocidad de agitación de 300 rpm y una presión interna del fermentador de 200 kPa durante 8 días. La concentración de glucosa fue mantenida a entre 1% y 2% por un método de alimentación discontinua hasta el día 4, y a entre 0,5% y 1% después del mismo.

Después del cultivo, la producción de ácido araquidónico aumentó por la adición de sales, confirmando la eficacia de la adición de sales y los intervalos de concentración eficaces.

Tabla 2

Cantidad de KH_2PO_4 añadida	0%	0,075% (5,5 mM)	0,3% (22 mM)	1,2% (88 mM)
Cantidad de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ añadida	0%	0,0125% (0,61 mM)	0,05% (2,5 mM)	0,2% (9,8 mM)
Cantidad de Na_2SO_4 añadida	0%	0,025% (1,8 mM)	0,1% (7,0 mM)	0,4% (28 mM)
Cantidad de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ añadida	0%	0,0125% (0,85 mM)	0,05% (3,4 mM)	0,2% (14 mM)
Cantidad de ácido araquidónico producido	2,11 g/l	2,61 g/l	2,90 g/l	1,95 g/l

Ejemplo 3

Se usó *Mortierella alpina* CBS 754.68 como microorganismo productor de ácido araquidónico. Cada uno de cuatro medios de cultivo que contenían 2% de glucosa, 1,5% de polvo de soja desgrasada, 0,1% de aceite de soja y las sales mostradas en la Tabla 3 en 25 litros se preparó en un fermentador de 50 litros, y el pH inicial se ajustó a 6,0. Se inocularon cincuenta ml del precultivo líquido en el mismo y después se sometió a un cultivo con aireación/agitación a 28 °C, una tasa de aireación de 1,0 vvm, una velocidad de agitación de 300 rpm y una presión interna del fermentador de 200 kPa durante 8 días. La concentración de glucosa fue mantenida a entre 1% y 2% por un método de alimentación discontinua hasta el día 4, y a entre 0,5% y 1% después del mismo.

En el medio de cultivo exento de sales, los microorganismos se propagaron con la morfología micelial en un estado mixto de los tipos gránulo y pulpa, y la mayoría del tipo gránulo tomó la forma de grano de arroz con un tamaño de aproximadamente 0,5 a 1,5 mm. En el medio en el que sólo se añadieron iones fosfato, los microorganismos se propagaron en la forma de pulpa muy fina, y la fluidez del medio de cultivo disminuyó sustancialmente. Por el contrario, en el medio de cultivo en el que se añadieron iones magnesio, iones calcio e iones sodio, la mayoría de las células microbianas tomó la forma de gránulos globulares con un diámetro de aproximadamente 1 a 2 mm, y el resultado demostró ser alto en fluidez pero bajo en el contenido de lípido por las células microbianas. Sin embargo, en el medio de cultivo en el que se añadieron las cuatro sales, el cultivo tomó la forma de una mezcla de los tipos de los gránulos globulares finos y la pulpa, en la que la fluidez no fue deteriorada y se obtuvo un alto contenido de lípidos, logrando de este modo un rendimiento mejorado de ácido araquidónico.

Tabla 3

Cantidad de KH_2PO_4 añadida	0%	0%	0,3% (22 mM)	0,3% (22 mM)
Cantidad de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ añadida	0%	0,025% (1,2 mM)	0%	0,025% (1,2 mM)
Cantidad de Na_2SO_4 añadida	0%	0,05% (3,5 mM)	0%	0,05% (3,5 mM)
Cantidad de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ añadida	0%	0,025% (1,7 mM)	0%	0,025% (1,7 mM)
Cantidad de ácido araquidónico producido	2,30 g/l	2,20 g/l	2,33 g/l	3,10 g/l

Ejemplo 4

Se usaron *Mortierella elongata* IFO 8570, *Mortierella exigua* IFO 8571 y *Mortierella hygrophila* IFO 5941 como microorganismos productores de ácido araquidónico. Cada uno de seis medios de cultivo que contenían 2% de glucosa, 1,5% de proteína de soja comestible (fabricada por Ajinomoto Co. Ltd., Essan Protein SS), 0,1% de aceite de colza y las sales mostradas en la Tabla 4 en 25 litros se preparó en un fermentador de 50 litros, y el pH inicial se ajustó a 5,8. Se inició un cultivo con aireación/agitación a 24 °C, una tasa de aireación de 1,0 vvm, una velocidad de agitación de 200 rpm y una presión interna del fermentador de 1,0 kg/cm²G, y se continuó el cultivo durante 7 días. Usando el método de alimentación discontinua, la concentración de glucosa fue mantenida a 1,5% hasta el día 5 y no se añadió glucosa después del mismo. La glucosa se consumió el final del cultivo de 7 días.

Como resultado, se confirmó la mejora en el rendimiento de ácido araquidónico por adición de sales.

Tabla 4

Cantidad de KH ₂ PO ₄ añadida	0%	0,3% (22 mM)
Cantidad de MgCl ₂ ·6H ₂ O añadida	0%	0,05% (2,5 mM)
Cantidad de Na ₂ SO ₄ añadida	0%	0,1% (7,0 mM)
Cantidad de CaCl ₂ ·2H ₂ O añadida	0%	0,05% (3,4 mM)
<i>Mortierella elongata</i> IFO 8570 Cantidad de ácido araquidónico producido	1,50 g/l	2,20 g/l
<i>Mortierella exigua</i> IFO 8571 Cantidad de ácido araquidónico producido	1,20 g/l	1,45 g/l
<i>Mortierella hygrophila</i> IFO 5941 Cantidad de ácido araquidónico producido	1,25 g/l	1,45 g/l

Ejemplo 5

Se usó *Mortierella alpina* CBS 754.68 como microorganismo productor de ácido araquidónico. Cada uno de seis medios de cultivo que contenían las concentraciones iniciales de 2% de glucosa, 0,1% de aceite de soja y la fuente de nitrógeno y las sales mostradas en la Tabla 5 conteniendo también las añadidas por el método de alimentación discontinua en 25 litros se preparó en un fermentador de 50 litros, y el pH inicial se ajustó a 6,0. Se inocularon cien mililitros del precultivo líquido en el mismo, y después se sometió a un cultivo aireado y con agitación a 24 °C, una tasa de aireación de 1,0 vvm, una velocidad de agitación de 300 rpm y una presión interna del fermentador de 200 kPa durante 8 días.

Usando el método de alimentación discontinua, la concentración de glucosa fue mantenida a 1,5% hasta el día 4 y a entre 0,5% y 1% después del mismo. Cuando la fuente de nitrógeno se añadió mediante el método de alimentación discontinua en mitad del cultivo, la agitación fue aumentada a 300 rpm en los Nos. de condición 3 y 4 y a 400 rpm en los Nos. de condición 5 y 6 en la Tabla 5 a fin de mantener la concentración de oxígeno disuelto.

Como resultado del cultivo, se confirmó el aumento en la cantidad de ácido araquidónico producido por la adición de sales. Además, el efecto de la adición de sales también se confirmó incluso cuando se añadió una gran cantidad de fuentes nutrientes y se cultivó a concentraciones relativamente altas.

Tabla 5

Condición N°	1	2	3	4	5	6
Cantidad inicial de proteína de soja	1,5%	1,5%	1,5%	1,5%	1,5%	1,5%
Cantidad de proteína de soja añadida por método de alimentación discontinua durante el cultivo			0,6%	0,6%	1,6%	1,6%
Cantidad inicial de KH_2PO_4		0,3% (22 mM)		0,3% (22 mM)		0,3% (22 mM)
Cantidad inicial de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$		0,05% (2,5 mM)		0,05% (2,5 mM)		0,05% (2,5 mM)
Cantidad inicial de Na_2SO_4		0,1% (7,0 mM)		0,1% (7,0 mM)		0,1% (7,0 mM)
Cantidad inicial de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		0,05% (3,4 mM)		0,05% (3,4 mM)		0,05% (3,4 mM)
Cantidad de ácido araquidónico producido	3,60 g/l	4,90 g/l	5,00 g/l	6,81 g/l	7,32 g/l	9,04 g/l

Proteína de soja: nombre comercial; Esusan Meat, producto de Ajinomoto Co. Ltd.

Ejemplo 6

Se usó Mortierella alpina SAM1861 (FERM BP-3590) como microorganismo productor de ácido de Mead y Mortierella alpina SAM1860 (FERM BP-3589) como microorganismo productor de ácido dihomog-linolénico. Cada uno de cuatro (cepas 2 x 2) medios de cultivo que contenían las concentraciones iniciales de 2% de glucosa, 1,5% de proteína de soja (fabricada por Ajinomoto Co. Ltd., Essan Meat), 0,1% de aceite de oliva y las sales mostradas en la Tabla 6 en 5 litros se preparó en un fermentador de 10 litros, y el pH inicial se ajustó a 6,0. Se inocularon cien mililitros del precultivo líquido en el mismo, y después se sometió a un cultivo con aireación/agitación a 28 °C, una tasa de aireación de 1,0 vvm, y una velocidad de agitación de 300 rpm durante 8 días. La temperatura de cultivo fue reducida a 20 °C en el día 2. Usando el método de alimentación discontinua, la concentración de glucosa fue mantenida a entre 1% y 2%.

Como resultado, se confirmó el rendimiento mejorado de ácido de Mead y ácido dihomog-linolénico mediante la adición de sales.

Tabla 6

Cantidad de KH_2PO_4 añadida	0%	0,3% (22 mM)
Cantidad de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ añadida	0%	0,05% (2,5 mM)
Cantidad de Na_2SO_4 añadida	0%	0,1% (7,0 mM)
Cantidad de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ añadida	0%	0,05% (3,4 mM)
<u>Mortierella alpina</u> SAM1861 Cantidad de ácido de Mead producido	1,52 g/l	1,92 g/l
<u>Mortierella alpina</u> SAM1860 Cantidad de ácido dihomog-linolénico producido	2,06 g/l	2,31 g/l

Ejemplo 7

Se usó Mortierella alpina CBS 754.68 como microorganismo productor de ácido araquidónico. Seis mil litros de medio de cultivo líquido que contenía las concentraciones iniciales de 2% de glucosa, 4% de proteína de soja comestible, 0,1% de aceite de soja, 0,3% de KH_2PO_4 , 0,1% de Na_2SO_4 , 0,05% de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 0,05% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ se prepararon en un fermentador de 10 kilolitros, y el pH inicial se ajustó a 6,1. Se inocularon 30 litros del precultivo líquido en el mismo y después se inició un cultivo con aireación/agitación a 26°C, una tasa de aireación de 0,5 vvm, una velocidad de agitación de 30 rpm, y una presión interna del fermentador de 200 kPa. Desde el día 1, se continuó el cultivo ajustando la tasa de aireación y la velocidad de remoción para mantener la concentración de oxígeno disuelto. Además, se añadió 18% de glucosa en varias porciones desde el día 1 hasta el día 5 de cultivo.

Como resultado del cultivo con aireación/agitación durante 10 días, la cantidad de ácido araquidónico producida fue 13 g/l.

Referencia a los microorganismos depositados bajo la Regla 13-2

The International depository authority

Nombre: the National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology

Dirección: 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba city, Ibaraki pref., Japón

Microorganismo (1)

Nombre: Mortierella elongata SAM 0219

Fecha de deposición: 19 de marzo de 1986

Número de deposición: FERM BP-1239

Microorganismo (2)

Nombre: Mortierella alpina SAM 1860

Fecha de deposición: 30 de septiembre de 1991

Número de deposición: FERM BP-3589

Microorganismo (3)

Nombre: Mortierella alpina SAM 1861

Fecha de deposición: 30 de septiembre de 1991

Número de deposición: FERM BP-3590

REIVINDICACIONES

1. El uso, en un procedimiento para producir ácido graso insaturado o lípido que contiene tal ácido graso que comprende cultivar un microorganismo que pertenece al género *Mortierella* en un medio que contiene una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno, de un dicho medio que contiene iones fosfato, iones potasio, iones sodio, iones magnesio e iones calcio para controlar la morfología micelial del microorganismo *Mortierella* cultivado para que sea una mezcla de pulpa y gránulos, y en donde
5
- (i) la fuente de nitrógeno contiene una o más fuentes de nitrógeno derivadas de sojas, iones fosfato en el intervalo de 5 a 60 mM, iones potasio en el intervalo de 5 a 60 mM, iones sodio en el intervalo de 2 a 50 mM, iones magnesio en el intervalo de 0,5 a 9 mM e iones calcio en el intervalo de 0,5 a 12 mM, o
10
- (ii) el medio contiene iones fosfato en el intervalo de 10 a 45 mM, iones potasio en el intervalo de 10 a 45 mM, iones sodio en el intervalo de 5 a 40 mM, iones magnesio en el intervalo de 1 a 6 mM e iones calcio en el intervalo de 1 a 9 mM.
15
2. Uso según la reivindicación 1, opción (ii), en el que dicha fuente de nitrógeno se selecciona de: fuentes de nitrógeno derivadas de sojas, peptona, extracto de levadura, extracto de malta, extracto de carne, ácido casamínico, licor de maíz fermentado, urea, nitrato de amonio, sulfato de amonio.
20
3. Uso según la reivindicación 2, en el que el medio contiene una fuente de nitrógeno derivada de sojas, sola o en combinación con otra dicha fuente de nitrógeno.
4. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la fuente de nitrógeno derivada de sojas proporciona un contenido de nitrógeno de al menos 2% en peso con respecto a los componentes totales distintos al agua.
25
5. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha fuente de nitrógeno derivada de sojas es al menos una seleccionada de sojas desgrasadas, sojas no desgrasadas, y productos procesados de estas.
6. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que contiene una fuente de carbono seleccionada de glucosa, fructosa, xilosa, sacarosa, maltosa, almidón soluble, melazas, glicerol, manitol, ácido cítrico y almidón de maíz.
30
7. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el procedimiento es para producir un lípido microbiano que contiene el ácido graso insaturado, y en donde el porcentaje de triglicéridos en el lípido microbiano producido es 90% o superior.
8. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las sales que proporcionan dichos iones fosfato, potasio, sodio, magnesio y calcio se añaden hacia el final del crecimiento logarítmico de los microorganismos.
35
9. Uso según la reivindicación 8, en el que dichas sales se añaden hacia la mitad del crecimiento logarítmico de los microorganismos.
10. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho ácido graso insaturado se selecciona de ácido araquidónico, ácido γ -linolénico, ácido dihomo- γ -linolénico, ácido de Mead y ácido eicosapentaenoico.
11. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho microorganismo es *Mortierella alpina*, *Mortierella elongata*, *Mortierella exigua* o *Mortierella hygrophila*.