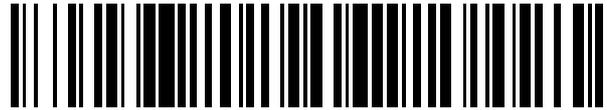


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 468**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/64** (2006.01)

**A23D 9/007** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.10.2003** **E 10009159 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2015** **EP 2267142**

54 Título: **Procedimiento de producción de grasa o aceite microbiano que tiene un bajo contenido de materia no saponificable y dicha grasa o aceite**

30 Prioridad:

**11.10.2002 JP 2002299199**

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

**10.11.2015**

73 Titular/es:

**NIPPON SUISAN KAISHA, LTD. (100.0%)  
6-2 Ohtemachi 2-chome Chiyoda-ku  
Tokyo 100-8686, JP**

72 Inventor/es:

**AKIMOTO, KENGO;  
HIGASHIYAMA, KENICHI;  
KAWASHIMA, HIROSHI y  
SUMIDA, MOTOO**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 550 468 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

Procedimiento de producción de grasa o aceite microbiano que tiene un bajo contenido de materia no saponificable y dicha grasa o aceite

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a un aceite en bruto que tiene un contenido de esteroides de tipo éster rebajado, y opcionalmente un contenido de materia no saponificable rebajado, y que comprende un ácido graso altamente insaturado como un ácido graso constituyente, y dicha grasa o aceite (aceite en bruto) y alimentos y bebidas, alimentos nutritivos terapéuticos, alimentos para animales y preparaciones farmacéuticas con la grasa o el aceite (aceite en bruto) incorporado en los mismos. También se divulga un procedimiento de producción de una grasa o  
10 aceite refinado, dicha grasa o aceite refinado y alimentos y bebidas, alimentos nutritivos terapéuticos, alimentos para animales y preparaciones farmacéuticas con la grasa o el aceite refinado. En la presente invención, la "materia no saponificable" y el "esterol de tipo éster" se refieren a los extraídos de microorganismos. Por lo tanto, la "materia no saponificable" y el "esterol de tipo éster" mencionados en la presente invención excluyen cualquier materia no saponificable y esteroles de tipo éster añadidos al aceite en bruto después de la extracción.

**Técnica anterior**

En lo referente a la biosíntesis de ácidos grasos altamente insaturados humanos (en lo sucesivo denominados en la presente memoria "PUFA"), existen dos series típicas, las series  $\omega 3$  y  $\omega 6$ .  $\omega$  (omega) se refiere al número de átomos de carbono desde el grupo metilo terminal del ácido graso hasta el átomo de carbono en el que está situado el primer doble enlace. Por ejemplo, en el caso de la serie  $\omega 6$ , el ácido linoleico (18:2  $\omega 6$ ) se somete repetidamente a insaturación y extensión de la longitud de la cadena de carbonos y por consiguiente se convierte en ácido  $\gamma$ -linolénico (18:3  $\omega 6$ ), ácido dihomo- $\gamma$ -linolénico (20:3  $\omega 6$ ), ácido araquidónico (20:4  $\omega 6$ ) y ácido 4,7,10,13,16-  
20 docosapentaenoico (22:5  $\omega 6$ ).

Asimismo, en el caso de la serie  $\omega 3$ , el ácido  $\alpha$ -linolénico (18:3  $\omega 3$ ) se somete repetidamente a insaturación y extensión de la longitud de la cadena de carbonos y por consiguiente se convierte en ácido eicosapentaenoico (20:5  $\omega 3$ ), ácido 7,10,13,16,19-docosapentaenoico (22:5  $\omega 3$ ) y ácido 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico (22:6  $\omega 3$ ). Se sabe que el ácido eicosapentaenoico (denominado en lo sucesivo en la presente memoria "EPA") y el ácido docosahexaenoico (denominado en lo sucesivo en la presente memoria "DHA") como PUFA de la serie  $\omega 3$  tienen muchas funciones fisiológicas, particularmente efectos profilácticos para enfermedades relacionadas con el estilo de vida, tales como esclerosis arterial y trombosis, y acción carcinostática y acción potenciadora de la capacidad de aprendizaje, y se han realizado diversos intentos de aplicar estos PUFA a preparaciones farmacéuticas y productos alimenticios específicos para atención sanitaria. Sin embargo, en los últimos años se ha prestado atención a las funciones fisiológicas de PUFA distintos a la serie  $\omega 3$  (series  $\omega 6$  y  $\omega 9$ ).

Aproximadamente 10% de los ácidos grasos que constituyen órganos importantes tales como la sangre y el hígado corresponde al ácido araquidónico. Por ejemplo, los ácidos grasos en los fosfolípidos de la sangre humana tienen una composición que comprende 11% de ácido araquidónico, 1% de ácido eicosapentaenoico y 3% de ácido docosahexaenoico. El ácido araquidónico está implicado, como un componente constituyente principal de una membrana celular, en la regulación del flujo al interior de la membrana para exhibir diversas funciones en el metabolismo del cuerpo y, además, representa un papel importante como un precursor directo de prostaglandinas.

En particular, el ácido araquidónico ha recibido atención recientemente como un nutriente para lactantes y como un ácido graso constituyente de un cannabinoide endógeno (2-araquidonoilmonoglicerol, anandamida) que tiene una acción de activación nerviosa. En general, al ingerir un alimento rico en ácido linoleico, el ácido linoleico se convierte en ácido araquidónico. Sin embargo, en pacientes que sufren enfermedades relacionadas con el estilo de vida y un grupo de reserva de enfermedades relacionadas con el estilo de vida, los lactantes y los ancianos, se rebaja la función de la enzima implicada en la biosíntesis. Por lo tanto, es probable que la cantidad de ácido araquidónico sea deficiente. Por esta razón, es deseable ingerir el ácido araquidónico directamente como una grasa o un aceite (ácido graso constituyente de triglicérido).

Para el EPA y el DHA como PUFA de la serie  $\omega 3$ , está el aceite de pescado como una fuente de suministro abundante. Por otra parte, el ácido  $\gamma$ -linolénico, el ácido dihomo- $\gamma$ -linoleínico, el ácido araquidónico y el ácido 4,7,10,13,16-docosapentaenoico (22:5  $\omega 6$ ) como PUFA de la serie  $\omega 6$  se obtienen difícilmente a partir de fuentes de suministro de grasas o aceites convencionales, y, actualmente, se usa generalmente una grasa o un aceite (triglicéridos) que comprende, como un ácido graso constituyente, PUFA producidos mediante fermentación de microorganismos. Por ejemplo, se ha propuesto un método en el que se produce una grasa o un aceite (triglicérido) que comprende ácido araquidónico como un ácido graso constituyente cultivando diversos microorganismos capaces de producir una grasa o un aceite (triglicéridos) que comprende ácido araquidónico como un ácido graso constituyente.  
55

Entre otras, se conoce la producción de una grasa o un aceite que contiene un alto contenido de ácido araquidónico (triglicéridos) usando particularmente microorganismos pertenecientes al género *Mortierella* (documentos JP-A-63[1988]/44891 y JP-A-63[1988]/12290). Basándose en muchos resultados de ensayo, se dice que estas grasas o

aceites son seguros. Sin embargo, como esta grasa o aceite se deriva de microorganismos, no hay experiencias satisfactorias en la ingestión. Por lo tanto, sin embargo, actualmente, las grasas o aceites en cuestión no se han introducido satisfactoriamente en la sociedad. Por otra parte, las grasas o aceites (triglicéridos) que comprenden, como un ácido graso constituyente, ácido araquidónico producido mediante fermentación se han empezado a usar en aplicaciones en las que se usaría ácido araquidónico, por ejemplo, en el campo de la nutrición de lactantes y, específicamente, en una leche de inicio.

La grasa o el aceite producidos a partir de productos naturales tales como animales y plantas se someten a procedimientos de refinado, tales como desgomado, desoxidación, desodorización, decoloración, destilación molecular y frigelización y a continuación se comercializan como grasa o aceite comestible. Por ejemplo, una grasa o un aceite obtenidos mediante expresión de plantas oleaginosas contienen una gran cantidad de impurezas y así no se pueden usar como tales como grasa o aceite comestible. Excepto para aceites de sésamo y aceites de oliva que se consumen a menudo, esta grasa o aceite generalmente se refina antes de usar como aceites comestibles.

Por ejemplo, en el procedimiento de desgomado, se eliminan fosfolípidos, carbohidratos, resinas, compuestos proteínicos, oligoelementos metálicos y materia colorante contenidos en los aceites no refinados. En el procedimiento de desoxidación (refinado alcalino), se eliminan ácidos grasos, materia colorante, fosfolípidos, oligoelementos metálicos, compuestos de azufre, materiales insolubles en aceite, y productos de oxidación. En el procedimiento de decoloración, se eliminan materia colorante, materia gomosa, oligoelementos metálicos, componentes de jabón, productos de oxidación y fosfolípidos. En el procedimiento de desodorización, se eliminan ácidos grasos, monoglicéridos, diglicéridos, aldehídos, alcoholes, cetonas, hidrocarburos, materia colorante, compuestos de azufre, peróxidos, productos de degradación oxidativa y otros componentes olorosos.

La grasa o el aceite contienen compuestos orgánicos, que son solubles en aceites y es menos probable que se degraden con un álcali, llamados "materia no saponificable". Por ejemplo, compuestos tales como alcoholes superiores, esteroides, hidrocarburos, tocoferoles y carotenoides se conocen como componentes constituyentes de la materia no saponificable. En los procedimientos de refinado de la grasa o el aceite, los contenidos de materia no saponificable se pueden reducir pero no se pueden eliminar completamente. Se sabe que los esteroides existen como componentes principales de la materia no saponificable en grasa o aceite producidos por microorganismos.

Los esteroides presentes en grasa o aceite se dividen en tipos libres y tipos éster. En los procedimientos de refinado, el tipo libre se puede eliminar, pero, por otra parte, el tipo éster difícilmente se puede eliminar. Por ejemplo, después de procedimientos de desgomado, desoxidación, decoloración y desodorización, los contenidos de esteroles (mg/g) de aceite de soja son 3,4, 3,0, 2,0 y 1,6, respectivamente, para el tipo libre, y es 0,6, 0,6, 0,6 y 0,6, respectivamente, para el tipo éster (véase ("Shokuyo Yushi no Kagaku" ("Science of edible fat or oil"), I. Aratani, Saiwai Shobo 1989 pp. 20-21).

Como los esteroides no eliminables y similares están contenidos como una parte de la materia no saponificable, en general, el contenido de materia no saponificable se usa ampliamente como un índice de la calidad de la grasa o el aceite refinado o como un índice de control del procedimiento de refinado. Por ejemplo, según Japanese Agricultural Standards, el contenido de materia no saponificable, p. ej., en aceites de cártamo comestibles, aceites de soja comestibles y aceites de palma comestibles, no debe ser mayor de 1,0% (523ª notificación (31 de marzo de 1969) del Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries). Para los lactantes, el colesterol es necesario, y se comercializa una leche de inicio que tiene un contenido de colesterol incrementado. Los esteroides derivados de plantas están contenidos en grasa o aceite vegetal comestible. La presencia de los esteroides derivados de vegetales inhibe perjudicialmente la absorción de colesterol en lactantes (Shokuhin to Kaihatsu (Food Processing And Ingredients), Vol. 33, Nº 2, pp. 42-45 (1998)). Por lo tanto, cuando se tienen en cuenta aplicaciones en las que se incorporan grasa o aceite comestible en una leche de inicio, se desea intensamente una grasa o un aceite comestible que tenga un bajo contenido de esteroides, esto es, que tenga un bajo contenido de materia no saponificable.

La mayor parte de la grasa o el aceite producido cultivando microorganismos pertenecientes al género *Mortierella* corresponde a triglicéridos (no menos de aproximadamente 70% en peso) y fosfolípidos, y la materia no saponificable está contenida como otro componente. La materia no saponificable comprende esteroides, tales como desmosterol, y ésteres esteróicos como componentes principales. La grasa o el aceite comestible están en forma de triglicéridos. Se puede proporcionar una grasa o un aceite refinado, del que se han eliminado fosfolípidos, sometiéndolo a la grasa o el aceite original producido cultivando microorganismos (grasa o aceite que se han proporcionado mediante extracción de células y se denominan "aceite en bruto") a procedimientos de refinado para grasa o aceite comestible (desgomado, desoxidación, desodorización y decoloración). Sin embargo, es difícil eliminar completamente la materia no saponificable mediante los procedimientos de refinado.

Por las razones de que es difícil la eliminación completa de la materia no saponificable y se desean generalmente una grasa o un aceite comestibles que tengan bajo contenido de materia no saponificable, se han realizado estudios sobre cómo eliminar la materia no saponificable. Como resultado, se ha investigado el refinado mediante cromatografía en columna: véanse los documentos JP-A-10/191886 y EP-A-0956774. Sin embargo, en esta técnica no se han realizado estudios detallados sobre los componentes que constituyen la materia no saponificable. Sigue desconociéndose un cambio en los componentes de la materia no saponificable después de refinar con respecto a los componentes antes del refinado, esto es, la información sobre qué componentes se han eliminado mediante

refinado.

La grasa o el aceite producidos cultivando microorganismos pertenecientes al género *Mortierella* se acumulan dentro del micelio. Por lo tanto, se debe llevar a cabo un cultivo para dar una concentración de células superior desde el punto de vista de la mejora de la rentabilidad de la producción de grasa o aceite que contiene ácidos grasos altamente insaturados. A fin de proporcionar una alta concentración de células, se debe incrementar la concentración de fuente de nitrógeno del medio convertido en componentes celulares. Según informes previos (los anteriores documentos EP-A-0956774 y JP-A-10/070992 correspondiente a EP-A-0957173), aunque se presente el contenido de materia no saponificable o de esteroides totales, la concentración de la fuente de nitrógeno en el medio usado en el cultivo de microorganismos es aproximadamente 1,5% como máximo.

Además, se ha presentado grasa o aceite que contiene ácidos grasos altamente insaturados que tiene un contenido de esteroides de no más de 1% (documento WO 97/43362). En este caso, sin embargo, la concentración de una fuente de nitrógeno en un medio usado en esta producción es baja y, en la producción de una grasa o un aceite que contiene ácido araquidónico producido usando *Mortierella alpina*, el cultivo se lleva a cabo en una baja concentración de fuente de nitrógeno de 1% (= extracto de levadura 0,5% +  $\text{NaNO}_3$  0,5%) (documento WO 97/37032). Así, por la razón de que se desean generalmente una grasa o un aceite comestible que tenga bajos contenido de materia no saponificable y contenido de esteroides, se han realizado estudios sobre una reducción en la materia no saponificable y/o los esteroides. Sin embargo, no hay una descripción sobre la materia no saponificable y los esteroides contenidos en grasa o aceite microbiano producido por un cultivo de microorganismos a alta concentración.

Según se describe anteriormente, los esteroides como un componente principal de la materia no saponificable se dividen en esteroides de tipo libre y esteroides de tipo éster. Los esteroides de tipo libre se pueden eliminar mediante los procedimientos de refinado, mientras que los esteroides de tipo éster difícilmente se pueden eliminar mediante los procedimientos de refinado. Por lo tanto, se considera que, a fin de proporcionar una grasa o un aceite refinado que tenga bajo contenido de materia no saponificable, específicamente bajo contenido de esteroides, es importante el desarrollo de una materia prima para refinado que tenga un bajo contenido de esteroides de tipo éster, que no se pueden eliminar mediante los procedimientos de refinado sin dificultades, esto es, un aceite en bruto que tenga bajo contenido de esteroides de tipo éster.

#### **Divulgación de la invención**

Así, la presente invención proporciona un aceite en bruto que tiene un contenido de esteroides de tipo éster rebajado, y opcionalmente un contenido de materia no saponificable rebajado, y que comprende un ácido graso altamente insaturado como un ácido graso constituyente según se indica en las reivindicaciones. Además, la presente divulgación proporciona un procedimiento para producir un aceite refinado a partir del aceite en bruto.

Por otra parte, la presente divulgación proporciona una grasa o un aceite refinado producido a partir de esta grasa o aceite.

Por otra parte, la presente invención proporciona diversos usos de la grasa o el aceite en bruto anterior.

Ya se ha presentado una grasa o un aceite que tiene un contenido de materia no saponificable y un contenido de esteroides rebajado y que comprende un ácido graso altamente insaturado como un ácido graso constituyente (Publicaciones de Patente Japonesa No Examinadas (Kokai) N° 10 (1998)-191886 y 10 (1998)-70992 y la Traducción Japonesa Publicada de la Publicación PCT N° 2000-510513). Sin embargo, estos procedimientos de producción no son adecuados para la producción rentable de grasa o aceite, debido a que la concentración de la fuente de nitrógeno del medio en el cultivo es baja. Por lo tanto, a fin de aumentar la rentabilidad, se ha mejorado la cantidad de grasa o aceite que contiene ácidos grasos altamente insaturados recuperada por cultivo realizando el cultivo en una concentración aumentada de fuente de nitrógeno del medio. Sin embargo, en este caso, se ha encontrado que el contenido de materia no saponificable y el contenido de esteroides de la grasa o el aceite también se aumentan. Según esto, es deseable desarrollar un procedimiento de producción que pueda satisfacer tanto una mejora en la rentabilidad mediante cultivo a alta concentración como una mejora en la calidad mediante una reducción en el contenido de materia no saponificable y el contenido de esteroides.

Los presentes inventores han realizado estudios extensos e intensivos sobre las condiciones de cultivo y las composiciones químicas de grasa o aceite producidos en medios que contienen una alta concentración de fuente de nitrógeno con vistas a proporcionar una grasa o un aceite (aceite en bruto) que tenga un contenido de esteroides de tipo éster rebajado y que comprenda un ácido graso altamente insaturado como un ácido graso constituyente producido mediante cultivo a alta concentración. Como resultado, sorprendentemente, una mejora en la forma de un rotor de agitación de un depósito de cultivo y una mejora en las condiciones de pH para la esterilización de la fuente de nitrógeno del medio han conducido al establecimiento de un procedimiento de producción de una grasa o un aceite (aceite en bruto) que tiene un contenido de materia no saponificable de no más de 2,2% en peso y/o un contenido de esteroides de tipo éster de no más de 1,0% en peso y que comprende un ácido graso altamente insaturado como un ácido graso constituyente.

Se sabe que el aporte de una cantidad de oxígeno satisfactoria es importante para la producción de ácidos grasos

altamente insaturados usando microorganismos mediante un método de cultivo líquido (Publicación de Patente Japonesa No Examinada (Kokai) N° 6 (1994)-153970). Un coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (kLa) se ha usado extensivamente como un índice de aporte de oxígeno en el cultivo líquido de microorganismos. Richard ha presentado que el kLa tiene una relación representada por la fórmula (1) con el consumo de energía por agitación por unidad de cantidad de líquido (Pg/V), la velocidad lineal de aireación (Vs) y la velocidad de agitación (N) (J. W. Richard; Prog. Ind. Microbiol., vol. 3, p. 141, (1961)).

$$kLa\alpha(Pg/V)^{0.4}Vs^{0.5}N^{0.5} \quad (1)$$

Basándose en los valores medidos de un depósito de cultivo que tiene un volumen de 0,2 a 60 m<sup>3</sup>, Fukuda et al. han presentado que la fórmula (2) proporciona una mejor correlación que la fórmula (1) (Fukuda et al., Hakkokogaku Kaishi, vol. 46, p. 829 (1968)).

$$kLa\alpha\{(Pg/V)^{0.4}Vs^{0.5}N^{0.5}\}^{1.4} \quad (2)$$

Matsushima et al. han verificado la universalidad de las fórmulas (1) y (2) y han presentado que las fórmulas (1) y (2) se pueden aplicar más ampliamente mediante la generalización que se representa mediante la fórmula (3) (Matsushima et al., Hakkokogaku Kaishi, vol. 50, p. 105 (1972)).

$$kLa\alpha\{(Pg/V)^{0.4}Vs^{0.5}N^{0.5}\}^{\alpha} \quad (3)$$

A partir de estas fórmulas de correlación, se considera que, bajo condiciones de consumo de energía por agitación (Pg/V) idéntica y velocidad lineal de aireación (Vs) idéntica, una velocidad de agitación (N) superior proporciona un coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (kLa) superior.

La demanda de energía de agitación por unidad de cantidad de líquido se representa mediante la fórmula (4).

$$Pg/V = \rho NpN^3d^5/V \quad (4)$$

en la que  $\rho$  representa la densidad del líquido, Np representa el número de potencia y d representa el diámetro del rotor de agitación.

A fin de proporcionar una velocidad de agitación (N) superior en un trabajo dado realizado, esto es, una demanda de energía de agitación idéntica, se considera ventajoso el uso de un depósito de cultivo que tenga un número de potencia (Np) menor y un diámetro del rotor de agitación (d) menor.

Taguchi et al., (Biseibutsugaku Kisokoza 7-Biseibutu Baiyo Kogaku- (Introduction to Microbiology 7-Microorganism Fermentation Engineering), editado por Hisaharu Taguchi y Shiro Nagai, Kyoritsu Shuppan Co., Ltd. p. 175 (1985)) describe que, considerando condiciones estándar para un depósito de cultivo con aireación-agitación, la relación d/D está en el intervalo de 1/4 a 1/3 como un intervalo estándar y típicamente es 1/3.

Sin embargo, esto solamente se establece en agua o una solución de cultivo que tenga una baja concentración de células. A fin de mejorar la rentabilidad de la producción, la concentración de una fuente de nitrógeno en el medio se debe incrementar para dar una concentración de células superior. Por lo tanto, los presentes inventores han pensado que, en una solución de cultivo que tenga una alta concentración de células, se debe tener en cuenta no solo el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (kLa) sino también la mezcladura de toda la solución de cultivo.

Además, se ha encontrado que, cuando el cultivo se llevaba a cabo en un medio que tenía una concentración aumentada de fuente de nitrógeno, esto es, a una concentración superior, se incrementan el contenido de materia no saponificable y el contenido de esteroides de tipo éster de una grasa o un aceite (aceite en bruto) que comprendía un ácido graso altamente insaturado como un ácido graso constituyente extraído de microorganismos, dando como resultado la producción de una grasa o un aceite que tiene una composición química no deseada debido a que el cultivo tenía una concentración aumentada de fuente de nitrógeno. Iwamoto ha presentado que el contenido de materia no saponificable en lípidos totales disminuye con un incremento en el contenido de grasa o aceite de las células ("Biseibutsuniyoru Yushino Seisan (Microbial production of fat or oil)", Hiroaki Iwamoto, (fuente desconocida)). Estudios efectuados por los presentes inventores también han mostrado que es probable que el cultivo en una concentración superior disminuya el contenido de grasa o aceite por célula. Los presentes inventores han considerado que el contenido de grasa o aceite por célula rebajado provocaba un contenido de materia no saponificable y un contenido de esteroides de tipo éster incrementados.

Según esto, los presentes inventores han considerado que, en el cultivo a alta concentración en el que la concentración de la fuente de nitrógeno en el medio es alta, lo que es importante es mejorar no solo el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (kLa) sino también la mezcladura de toda la solución de cultivo y así mejorar el contenido de grasa o aceite por célula. Los presentes inventores se han dirigido a una mejora en la conformación (forma) del rotor de agitación como un medio para conseguir este fin y han realizado estudios extensos e intensivos. Como resultado, los presentes inventores han tenido éxito en el aumento del contenido de grasa o aceite por célula y en la mejora de la productividad de ácidos grasos altamente insaturados, mediante

microorganismos en un cultivo, usando un depósito de cultivo con  $d/D$  (la relación del diámetro del rotor de agitación (=  $d$ ) al diámetro interno del depósito de cultivo (=  $D$ ) = 0,34 a 0,6. Además, se ha encontrado sorprendentemente que, en este caso, la grasa o el aceite que comprende un ácido graso altamente insaturado como un ácido graso constituyente extraído del microorganismo tenía un contenido de esteroides de tipo éster significativamente rebajado.

5 Además, se ha encontrado que, incluso en el caso de un depósito de cultivo con  $d/D$  = menor de 0,34, se puede conseguir una mejora en la productividad de un ácido graso altamente insaturado mediante microorganismos y una reducción en el contenido de esteroides de tipo éster esterilizando la fuente de nitrógeno en el medio a un valor de pH de no más de 5,0.

10 Basándose en esto, los presentes inventores han realizado estudios extensos e intensivos y, como resultado, han tenido éxito en la producción estable de una grasa o un aceite (aceite en bruto) que tiene un contenido de materia no saponificable y/o un contenido de esteroides de tipo éster rebajados adoptando un método en el que el cultivo se lleva a cabo usando un depósito de cultivo provisto de un rotor de agitación con una  $d/D$  = no menor de 0,34, o adaptando un método en el que, en el caso de un depósito de cultivo con una  $d/D$  = menor de 0,34, el cultivo se lleva a cabo en un medio que contiene una fuente de nitrógeno que se ha esterilizado a un valor de pH de no más de 5.

15 Según esto, la presente invención proporciona un aceite en bruto que tiene un contenido de esteroides de tipo éster rebajado, y opcionalmente un contenido de materia no saponificable rebajado, y que comprende un ácido graso altamente insaturado como un ácido graso constituyente según se indica en las reivindicaciones. Para producir el aceite en bruto, un microorganismo capaz de producir una grasa o un aceite que comprende el ácido graso insaturado como un ácido graso constituyente se puede cultivar en un medio que contiene una concentración de la  
20 fuente de nitrógeno de 2 a 15% dentro de un depósito de cultivo equipado con un rotor de agitación que satisface la demanda de que la relación del diámetro del rotor de agitación (=  $d$ ) al diámetro interno del depósito de cultivo (=  $D$ ) sea  $d/D$  = 0,30 a 0,6.

25 La presente invención proporciona en algunas realizaciones un aceite en bruto que tiene un contenido de materia no saponificable de no más de 2,2% en peso, que se puede producir mediante el procedimiento anterior. La presente divulgación también proporciona una grasa o un aceite refinado producido refinando el aceite en bruto anterior.

La presente invención también proporciona un alimento o una bebida general, un alimento funcional, un complemento nutricional, una leche de inicio para prematuros, una leche de inicio para recién nacidos a término, un alimento para lactantes, un alimento para madres gestantes y lactantes o un alimento para ancianos, que comprende el aceite en bruto anterior incorporado en los mismos.

30 La presente invención también proporciona un alimento nutritivo terapéutico que comprende el aceite en bruto anterior incorporado en el mismo opcionalmente junto con un vehículo neutro adecuado para la administración bucal, intrarrectal o parenteral.

La presente invención también proporciona un alimento para animales o peces, que comprende el aceite en bruto anterior incorporado en el mismo.

35 La presente invención también proporciona una composición farmacéutica, que comprende el aceite en bruto anterior incorporado en la misma. La presente invención también proporciona una composición farmacéutica preparada usando como materia prima el aceite en bruto anterior.

### Realizaciones de la invención

40 La presente invención se refiere a una grasa o un aceite (aceite en bruto) que tiene un contenido de esteroides de tipo éster rebajado, y opcionalmente un contenido de materia no saponificable rebajado, y que comprende un ácido graso altamente insaturado como un ácido graso constituyente según se indica en las reivindicaciones, y a alimentos y bebidas, alimentos nutricionales terapéuticos, alimentos para animales y preparaciones farmacéuticas, con el aceite en bruto incorporado en los mismos.

45 La grasa o el aceite (aceite en bruto) según la presente invención es una grasa o un aceite microbiano obtenido de un producto de cultivo y se puede preparar cultivando un microorganismo capaz de producir una grasa o un aceite que comprende el ácido graso altamente insaturado como un ácido graso constituyente en un medio que contiene una concentración de la fuente de nitrógeno de 2 a 15%. La grasa o el aceite (aceite en bruto) tiene un contenido de esteroides de tipo éster rebajado que se puede conseguir mediante el cultivo en un depósito de cultivo provisto de un rotor de agitación de  $d/D$  = 0,34 a 0,6, o mediante el cultivo en un medio que contiene una fuente de nitrógeno  
50 esterilizado a un valor del pH de no más de 5 cuando se usa un depósito de cultivo de  $d/D$  menor de 0,34.

Específicamente, la grasa o el aceite (aceite en bruto) puede tener un contenido de materia no saponificable de no más de 2,2% en peso, preferiblemente no más de 2,0% en peso, más preferiblemente no más de 1,8% en peso. Tiene un contenido de esteroides de tipo éster de no más de 1,0% en peso, preferiblemente no más de 0,8% en peso, más preferiblemente no más de 0,6% en peso, y un contenido de ácido graso altamente insaturado, basado en el  
55 ácido graso total en la grasa o el aceite (aceite en bruto), de no más de 30% en peso, lo más preferiblemente no más de 40% en peso. Por lo tanto, se debe llevar a cabo el cultivo de un microorganismo capaz de producir una

grasa o un aceite (triglicérido) que comprende el ácido graso altamente insaturado como un ácido graso constituyente.

Los microorganismos mencionados en la presente memoria son microorganismos que pueden producir, principalmente como un ácido graso constituyente de triglicérido, al menos un ácido graso altamente insaturado seleccionado de ácido dihomo- $\gamma$ -linoléico (20:3  $\omega$ 6) y ácido 5,8,11-eicosatrienoico (ácido de Mead: 20:3  $\omega$ 9). Otros ácidos grasos altamente insaturados, no reivindicados, incluyen ácidos grasos altamente insaturados  $\omega$ 6 que tienen 18 o más átomos de carbono y 3 o más dobles enlaces, ácidos grasos altamente insaturados  $\omega$ 9 que tienen 18 o más átomos de carbono y 2 o más dobles enlaces y ácidos grasos altamente insaturados  $\omega$ 3 que tienen 18 o más átomos de carbono y 3 o más dobles enlaces.

Ácidos grasos altamente insaturados  $\omega$ 6 que tienen 18 o más átomos de carbono y 3 o más dobles enlaces incluyen ácido  $\gamma$ -linoléico (ácido 6,9,12-octadecatrienoico), ácido dihomo- $\gamma$ -linoléico (ácido 8,11,14-eicosatrienoico), ácido araquidónico (ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico), ácido 7,10,13,16-docosatetraenoico (22:4  $\omega$ 6) y DPA  $\omega$ 6 (ácido 4,7,10,13,16-docosapentaenoico). Ácidos grasos altamente insaturados  $\omega$ 9 que tiene 18 o más átomos de carbono y 2 o más dobles enlaces incluyen ácido 6,9-octadecadienoico, ácido 8,11-eicosadienoico y ácido de Mead (ácido 5,8,11-eicosatrienoico) y ácidos grasos altamente insaturados  $\omega$ 3 que tienen 18 o más átomos de carbono y 3 o más dobles enlaces incluyen ácido  $\alpha$ -linoléico (ácido 9,12,15-octadecatrienoico), ácido 6,9,12,15-octadecatetraenoico (18:4  $\omega$ 3), ácido 8,11,14,17-eicosatetraenoico (20:4  $\omega$ 3), EPA (ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico), DPA  $\omega$ 3 (ácido 7,10,13,16,19-docosapentaenoico) y DHA (ácido 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico).

Según esto, en la presente invención, se pueden usar todos los microorganismos con tal de que puedan producir una grasa o un aceite (triglicéridos) que comprenda los ácidos grasos altamente insaturados indicados en las reivindicaciones como ácidos grasos constituyentes. Microorganismos capaces de producir una grasa o un aceite (triglicéridos) que comprende ácido araquidónico como ácidos grasos constituyentes incluyen, por ejemplo, microorganismos pertenecientes al género *Mortierella*, *Conidiobolus*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Rhodotorula*, *Entomophthora*, *Echinosporangium* y *Saprolegnia*.

Microorganismos pertenecientes al subgénero *Mortierella* del género *Mortierella* incluyen, por ejemplo, el subgénero *Mortierella elongata*, *Mortierella exigua*, *Mortierella hygrophila* y *Mortierella alpina*. Ejemplos específicos de los mismos incluyen las cepas *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, CBS 527.72, CBS 529.72, CBS 608.70 y CBS 754.68.

Por ejemplo, microorganismos pertenecientes al género *Cryptocodinium*, *Thrautochytrium*, *Schizochytrium*, *Ulkenia*, *Japonochytrium* o *Haliphthoros* también se pueden mencionar como microorganismos capaces de producir DHA.

Todas estas cepas están disponibles sin restricción de the Institute for Fermentation, Osaka (IFO), American Type Culture Collection (ATCC) y Centrralbureau voor Schimmelcultures (CBS). Además, también se puede usar una cepa aislada del suelo por un grupo de investigación implicado en la presente invención, es decir, *Mortierella elongata* SAM 0219 (FERM P-8703) (FERM BP-1239).

A fin de cultivar la cepa usada en la presente invención, esporas, micelios o una solución del cultivo de siembra obtenida cultivando por adelantado o células recogidas del cultivo de siembra se inoculan en un medio líquido, seguido por un cultivo principal. En el caso de un medio líquido, fuentes de carbono utilizables en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, las usadas comúnmente en la técnica, por ejemplo, glucosa, fructosa, xilosa, sacarosa, maltosa, almidón soluble, melaza, glicerol, manitol y almidones sacarificados.

Fuentes de nitrógeno incluyen fuentes de nitrógeno naturales tales como peptonas, extractos de levadura, extractos de malta, extractos de carne, casaminoácidos, licores de maceración de maíz, proteínas de habas de soja, habas de soja desengrasadas y harinas de semillas de algodón, fuentes de nitrógeno orgánicas tales como urea, y fuentes de nitrógeno inorgánicas tales como nitrato sódico, nitrato amónico y sulfato amónico. En particular, se pueden mencionar como la fuente de nitrógeno fuentes de nitrógeno obtenidas de habas de soja, específicamente habas de soja, habas de soja desengrasadas, escamas de habas de soja, proteínas de haba de soja comestibles, restos de cuajada de habas, leche de soja y harina de soja. En particular, se pueden usar sojas desengrasadas desnaturalizadas térmicamente, más preferiblemente productos preparados tratando térmicamente habas de soja desengrasadas a aproximadamente 70 a 90°C y eliminando un componente soluble en etanol, individualmente o en una combinación de dos o más de ellas con la fuente de nitrógeno anterior.

Además, si es necesario, también se pueden usar como nutrientes secundarios iones fosfato, iones potasio, iones sodio, iones magnesio, iones calcio y, además, iones metálicos tales como iones hierro, cobre, cinc, manganeso, níquel y cobalto, y una vitamina.

Las concentraciones de estos componentes del medio no están particularmente limitadas con tal de que no se inhiba el crecimiento de los microorganismos. En la práctica, la cantidad total de las fuentes de carbono añadida es generalmente de 0,1 a 40% en peso, preferiblemente de 1 a 25% en peso, y la cantidad total de las fuentes de

nitrógeno añadida es preferiblemente de 2 a 15% en peso, más preferiblemente de 2 a 10% en peso. Más preferiblemente, la cantidad inicial de las fuentes de carbono añadida es de 1 a 5% en peso, y la cantidad inicial de las fuentes de nitrógeno añadida es de 3 a 8% en peso, y, en el transcurso del cultivo, se pueden alimentar la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno y, más preferiblemente, solamente la fuente de carbono.

- 5 A fin de incrementar el rendimiento de ácidos grasos insaturados, por ejemplo, se pueden usar hidrocarburos tales como hexadecano u octadecano; ácidos grasos o sus sales tales como ácido oleico o ácido linoleico, o ésteres de ácido graso, por ejemplo, ésteres etílicos, ésteres de ácido graso de glicerina o ésteres de ácido graso de sorbitano; o una grasa o un aceite tales como aceites de oliva, aceites de soja, aceites de colza, aceites de algodón o aceites de palma, como precursores de ácidos grasos insaturados, bien individualmente o bien en combinación. La cantidad del sustrato añadida es de 0,001 a 10%, preferiblemente de 0,5 a 10%, basado en el medio. El cultivo también se puede llevar a cabo usando estos sustratos como una única fuente de carbono.

- 15 La temperatura de cultivo de microorganismos, que producen ácidos grasos altamente insaturados, varía dependiendo del microorganismo usado. Sin embargo, la temperatura de cultivo puede ser de 5 a 40°C, preferiblemente de 20 a 30°C. Se puede usar un método en el que el cultivo se lleva a cabo a de 20 a 30°C para hacer crecer las células y entonces el cultivo se continúa a de 5 a 20°C para producir ácidos grasos insaturados. La proporción de un ácido graso altamente insaturado en el ácido graso producido también se puede incrementar mediante este control de la temperatura. Se lleva a cabo un cultivo de siembra mediante un cultivo con aireación-agitación, cultivo con oscilación, cultivo sólido o cultivo en líquido estacionario, y el cultivo principal se lleva a cabo mediante cultivo con aireación-agitación. El medio en el momento del comienzo del cultivo principal (en el momento de la inoculación de la solución del cultivo de siembra) se ajusta hasta un pH de 5 a 7, preferiblemente de 5,5 a 6,5. El cultivo principal se lleva a cabo generalmente durante de 2 a 30 días, preferiblemente de 5 a 20 días, más preferiblemente de 5 a 15 días.

- 25 La grasa o el aceite (aceite en bruto) según la presente invención es una grasa o un aceite microbiano obtenido de un producto de cultivo preparado cultivando un microorganismo capaz de producir una grasa o un aceite (triglicérido) que comprende el ácido graso altamente insaturado como un ácido graso constituyente, y el rasgo más característico de la presente invención es que se reduce el contenido de esteroides de tipo éster del aceite en bruto. La reducción se puede conseguir mediante cultivo principal en un depósito de cultivo provisto de un rotor de agitación de  $d/D = 0,34$  a  $0,6$ , o mediante cultivo principal en un medio que contiene una fuente de nitrógeno esterilizado a un valor de pH de no más de 5 cuando se usa un depósito de cultivo de  $d/D =$  menor de  $0,34$ . Así, se describe en la presente memoria un método que puede rebajar el contenido de esteroides de tipo éster, y opcionalmente rebajar el contenido de materia no saponificable, en el aceite en bruto usando microorganismos capaces de producir una grasa o un aceite (triglicéridos) que comprende ácidos grasos altamente insaturados como un ácido graso constituyente.

- 35 En el método de cultivo según la presente descripción, el contenido de esteroides de tipo éster en el aceite en bruto se puede rebajar mediante el cultivo en un depósito de cultivo de  $d/D$  (la relación del diámetro del rotor de agitación (=  $d$ ) al diámetro interno del depósito de cultivo (=  $D$ )) =  $0,30$  a  $0,6$ , preferiblemente  $d/D = 0,34$  a  $0,55$ , más preferiblemente  $d/D = 0,37$  a  $0,55$ , lo más preferiblemente  $d/D = 0,42$  a  $0,55$ . A fin de conseguir un mejor efecto mediante la relación  $d/D$ , se desea el uso de un depósito de cultivo que tenga un volumen de no menos de  $1 \text{ m}^3$ , preferiblemente no menos de  $5 \text{ m}^3$ , más preferiblemente no menos de  $10 \text{ m}^3$ . En cuanto al rotor de agitación, se pueden usar rotores de agitación que incluyen álabes de turbina en una fase o en una pluralidad de fases sin limitación particular.

- 45 Cuando se lleva a cabo un ajuste del pH del medio después de la esterilización del medio, el procedimiento de ajuste se debe llevar a cabo asépticamente con precaución, de modo que no se provoque una contaminación con un microorganismo no deseado. Por lo tanto, el ajuste del pH se lleva a cabo generalmente antes de la esterilización del medio. Por ejemplo, cuando un medio, que no provoca ningún cambio de pH durante la esterilización, se ajusta hasta pH 6,0 en el momento del comienzo del cultivo, el ajuste del pH del medio de un modo no aséptico hasta 6,0 antes de la esterilización elimina la necesidad de un ajuste aséptico del pH después de la esterilización. A fin de reducir el esteroide de tipo éster incluso en un depósito de cultivo de  $d/D =$  menor de  $0,34$ , los presentes inventores han apuntado a y han realizado estudios sobre la influencia de la condición de pH en la etapa de esterilización sobre la productividad del cultivo y la composición del producto. Como resultado, los presentes inventores han encontrado que, antes de la esterilización de un medio ajustado hasta un pH no mayor de 5, se prefiere el reajuste del pH hasta un valor adecuado para el comienzo del cultivo después de la esterilización.

- 55 Específicamente, una solución que contiene una fuente de nitrógeno del medio se ajusta hasta un pH de 4 a 5, preferiblemente un pH de 4,2 a 4,7, seguido por esterilización. El medio esterilizado como tal u opcionalmente después de la adición de otro medio que se va a esterilizar se usa para preparar un medio de inicio de cultivo que a continuación se ajusta hasta un pH de 5 a 7, preferiblemente un pH de 5,5 a 6,5. Una solución del cultivo de siembra se inocula al medio para comenzar el cultivo principal. Ajustadores del pH utilizables para ajustar el pH de la solución que contiene la fuente de nitrógeno antes de la esterilización incluyen, pero no se limitan particularmente a, ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido nítrico y ácido carbónico o sus sales, que se usan individualmente o en una combinación de dos o más de ellos. Reajustadores para el pH del medio después de la esterilización incluyen, pero no se limitan particularmente a, compuestos de hidróxido tales como hidróxido sódico e hidróxido

potásico y amoníaco y sales de amonio, que se usan individualmente o en una combinación de dos o más de ellos.

Se sabe que microorganismos pertenecientes al subgénero *Mortierella* del género *Mortierella* son capaces de producir grasa o aceite (triglicéridos) que comprende ácido araquidónico como un ácido graso constituyente principal. Los presentes inventores han obtenido microorganismos capaces de producir grasa o aceite (triglicérido) que comprende ácido dihomo- $\gamma$ -linolénico como un ácido graso constituyente principal (Publicación de Patente Japonesa No Examinada (Kokai) N° 5 (1993)-91887) y microorganismos capaces de producir grasa o aceite que comprende ácidos grasos altamente insaturados  $\omega$ 9 como un ácido graso constituyente principal (triglicérido) (Publicación de Patente Japonesa No Examinada (Kokai) N° 5 (1993)-91888) sometiendo las cepas anteriores a un tratamiento de mutación.

Además, los presentes inventores también han obtenido microorganismos resistentes a una fuente de carbono muy concentrada (documento WO 98/39468). Los anteriores microorganismos son microorganismos pertenecientes al subgénero *Mortierella* del género *Mortierella*, y el contenido de materia no saponificable y/o el contenido de esteroides de tipo éster de un aceite en bruto se puede reducir fácilmente mediante el método de cultivo descrito en la presente memoria, específicamente mediante cultivo principal en un depósito de cultivo provisto de un rotor de agitación de  $d/D = 0,34$  a  $0,6$ , o mediante cultivo principal en un medio que contiene una fuente de nitrógeno esterilizado a un valor de pH de no más de 5 y que tiene una concentración de la fuente de nitrógeno en el medio de 2 a 15% cuando se usa un depósito de cultivo de  $d/D =$  menor de  $0,34$ .

Sin embargo, los microorganismos usados en la presente invención no se limitan a los pertenecientes al subgénero *Mortierella* del género *Mortierella*, y se contempla que se pueden producir aceites en bruto que tienen un contenido de esteroides de tipo éster rebajado aplicando, a microorganismos capaces de producir grasa o aceite (triglicéridos) que comprende un ácido graso altamente insaturado según las reivindicaciones como un ácido graso constituyente, el método de cultivo según la presente invención, específicamente mediante cultivo principal en un depósito de cultivo provisto de un rotor de agitación de  $d/D = 0,34$  a  $0,6$ , o mediante cultivo principal en un medio que contiene una fuente de nitrógeno esterilizado a un valor de pH de no más de 5 y que tiene una concentración de la fuente de nitrógeno en el medio de 2 a 15% cuando se usa un depósito de cultivo de  $d/D =$  menor de  $0,34$ .

Métodos utilizables para obtener un aceite en bruto a partir de microorganismos, que han acumulado una grasa o aceite que comprende un ácido graso altamente insaturado como un ácido graso constituyente que tiene un contenido de materia no saponificable y/o un contenido de esteroides de tipo éster rebajado producido mediante cultivo principal en un depósito de cultivo provisto de un rotor de agitación de  $d/D = 0,34$  a  $0,6$ , o mediante cultivo principal en un medio que contiene una fuente de nitrógeno esterilizado a un valor de pH de no más de 5 y que tiene una concentración de la fuente de nitrógeno en el medio de 2 a 15% cuando se usa un depósito de cultivo de  $d/D =$  menor de  $0,34$ , incluyen un método en el que, después de la terminación del cultivo, la solución de cultivo como tal o después de un tratamiento tal como esterilización, concentración o acidificación, se somete a medios de separación sólido-líquido convencionales, tales como sedimentación simple, centrifugación y/o filtración, para recoger las células cultivadas.

Se pueden añadir agentes coagulantes o adyuvantes de la filtración desde el punto de vista del favorecimiento de la separación sólido-líquido. Agentes coagulantes incluyen, por ejemplo, cloruro de aluminio, cloruro cálcico, algina y quitosano. Adyuvantes de la filtración incluyen, por ejemplo, tierra diatomácea. Preferiblemente, las células cultivadas se lavan con agua, se Trituran y se secan. El secado se puede llevar a cabo, p. ej., mediante liofilización, secado al aire o secado en lecho fluidizado. Medios para obtener un aceite en bruto a partir de células secadas pueden ser extracción con un disolvente orgánico o expresión. Sin embargo, se prefiere la extracción con un disolvente orgánico bajo una corriente de nitrógeno gaseoso.

Disolventes orgánicos incluyen etanol, hexano, metanol, etanol, cloroformo, diclorometano, éter de petróleo y acetona. También se puede usar una alternancia de extracción con metanol y éter de petróleo y extracción con un disolvente monofásico de cloroformo-metanol-agua. Sin embargo, los métodos de extracción para obtener el aceite en bruto no están limitados a los métodos anteriores, y se puede usar cualquier método, que pueda extraer eficazmente grasa o aceite acumulado dentro de las células. Por ejemplo, se puede usar la extracción supercrítica como un método eficaz.

Un aceite en bruto buscado se puede obtener eliminando el componente de disolvente orgánico o fluido supercrítico del extracto obtenido mediante la extracción con el disolvente orgánico o el fluido supercrítico bajo presión reducida u otras condiciones. Además, alternativamente, la extracción se puede llevar a cabo usando células húmedas. En este caso, se usan disolventes compatibles con agua, tales como metanol, etanol y acetona, o disolventes mixtos compatibles con agua y compuestos por los disolventes anteriores y agua y/u otros disolventes. Los otros procedimientos son iguales que los descritos anteriormente.

El aceite en bruto que tiene un contenido de esteroides de tipo éster rebajado y que comprende un ácido graso altamente insaturado según se indica en las reivindicaciones como un ácido graso constituyente se puede combinar con un alimento para animales para uso directo. Sin embargo, cuando se tiene en cuenta la aplicación a alimentos, antes del uso, el aceite en bruto se somete preferiblemente a un procedimiento de refinado de grasa o aceite convencional. Procedimientos de refinado de grasa o aceite utilizables en la presente memoria incluyen

procedimientos convencionales tales como desgomado, desoxidación, desodorización, decoloración, un tratamiento en columna, destilación molecular y frigelización. Por lo tanto, se puede obtener una grasa o un aceite refinado, de los que se ha rebajado impredeciblemente el contenido de esteroides de tipo éster, sometiendo el aceite en bruto según la presente invención, que tiene un contenido de esteroides de tipo éster rebajado inalcanzable mediante el procedimiento de refinado de grasa o aceite convencional, a procedimientos de refinado de grasa o aceite.

La carga de procesamiento en el procedimiento de refinado también se puede disminuir sometiendo al aceite en bruto, según la presente invención y que tiene un contenido de esteroides de tipo éster rebajado, al procedimiento de refinado de grasa o aceite. Específicamente, por ejemplo, se puede proporcionar una grasa o un aceite refinado que tiene un contenido de esteroides de tipo éster igual al de la técnica anterior incluso después de una reducción en el tiempo de tratamiento del procedimiento de refinado y una reducción en el coste energético. Además, se puede proporcionar una grasa o aceite refinado que tiene un contenido de esteroides de tipo éster que es inferior al de la técnica anterior usando el mismo tiempo de tratamiento y coste energético que la técnica anterior. La grasa o el aceite (triglicérido) refinado es utilizable en una gama infinita de aplicaciones, por ejemplo, en materias primas y aditivos para alimentos, bebidas, cosméticos y preparaciones farmacéuticas, y el propósito y la cantidad de uso no están limitados.

Por ejemplo, composiciones alimenticias, en las que se puede usar la grasa o el aceite refinado, incluyen alimentos generales y, además, alimentos funcionales, complementos nutricionales, leche de inicio para prematuros, leche de inicio para recién nacidos a término, leche de inicio para lactantes, alimentos para lactantes, alimentos para madres gestantes y lactantes o alimentos para ancianos.

Ejemplos de alimentos que contienen grasa o aceite incluyen: alimentos naturales que contienen inherentemente grasa o aceite, tales como carne, pescado o nueces; alimentos a los que se añaden grasa o aceite en el momento de cocinar, tales como sopas; alimentos que usan grasa o aceite como medio de calentamiento, tales como rosquillas; alimentos grasos u oleosos tales como mantequilla; alimentos procesados a los que se añade grasa o aceite en el momento del procesamiento, tales como galletas o bizcochos; o alimentos sobre los que se pulveriza o reviste grasa o aceite en el momento del procesamiento final, tales como bizcochos duros. Además, la grasa o el aceite refinado se puede añadir a alimentos agrícolas, alimentos fermentados, alimentos para ganado, alimentos marinos o bebidas libres de grasa y aceite. La grasa o el aceite refinado se puede usar en la forma de alimentos funcionales y preparaciones farmacéuticas, por ejemplo, se puede usar en formas procesadas tales como nutrientes enterales, polvos, gránulos, pastillas para chupar, líquidos para uso interno, suspensiones, emulsiones y jarabes.

### 30 Ejemplos

La presente invención se describirá con más detalle con referencia a los siguientes ejemplos y ejemplos de referencia. Sin embargo, se debe apuntar que la presente invención no está limitada solo a estos ejemplos.

Ejemplo de referencia 1: Producción de ácido araquidónico,  $d/D = 0,34$ , concentración de harina de soja en el medio = 6%

Se proporcionó *Mortierella alpina* (CBS 754.68) como un hongo productor de ácido araquidónico. Una cepa estándar de *Mortierella alpina* se inoculó en un medio (extracto de levadura al 1%, glucosa al 2%, pH 6,3). Se inició un cultivo de siembra (primera fase) bajo condiciones de oscilación alternativa a 100 rpm y una temperatura de 28°C, y el cultivo de siembra se continuó durante 3 días. Posteriormente, se prepararon 30 l de un medio (extracto de levadura al 1%, glucosa al 2%, aceite de soja al 0,1%, pH 6,3) en un depósito de cultivo de aireación-agitación de 50 l de volumen. La solución del cultivo de siembra (primera fase) se inoculó en el medio. El cultivo de siembra (segunda fase) se comenzó bajo condiciones de velocidad de agitación 200 rpm, temperatura 28°C y presión interna del depósito 150 kPa, y el cultivo de siembra se continuó durante 2 días.

Posteriormente, se prepararon 4.500 l de un medio (medio A: harina de soja 336 kg,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  16,8 kg,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  2,8 kg,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2,8 kg, aceite de soja 5,6 kg). El medio se ajustó hasta pH 6,3 para la condición (1-1) y hasta pH 4,5 para la condición (1-2). Tanto el medio para la condición (1-1) como el medio para la condición (1-2) se esterilizaban bajo condiciones de 121°C y 20 min. Se preparó medio C como otro medio esterilizando 1.000 l de un medio (medio B: monohidrato de glucosa 112 kg) bajo condiciones de 140°C durante 40 s y añadiendo el medio esterilizado al medio A anterior. El medio C como tal se usó para la condición (1-1) y el medio C se ajustó hasta pH 6,3 para la condición (1-2). La solución del cultivo de siembra (segunda fase) se inoculó a continuación en los medios así preparados, y el volumen se ajustó hasta una cantidad inicial de solución de cultivo de 5.600 l en total (volumen del depósito de cultivo: 10 kl).

El cultivo se comenzó bajo condiciones de temperatura 26°C, caudal de aire 49  $\text{Nm}^3/\text{h}$  y presión interna 200 kPa.

La forma del depósito de cultivo era tal que se proporcionaban turbinas de seis álabes en tres fases y la relación del diámetro del rotor de agitación (= d) al diámetro interno del depósito (= D) era  $d/D = 0,34$ . Mientras se alimentaba un medio como el mostrado en la Tabla 1, se llevaba a cabo un cultivo principal durante 306 h. Al final del cultivo, la cantidad de la solución de cultivo era 7.750 l debido a la influencia de un incremento en la cantidad de la solución por la alimentación del medio y una disminución en la cantidad de la solución por evaporación de la solución. Al final del cultivo, la concentración de ácido araquidónico producido por litro de la solución de cultivo era 18,2 g/l para la

condición (1-1) y 18,4 g/l para la condición (1-2).

Tabla 1: Alimentación al medio en el Ejemplo de referencia 1

Momento del cultivo principal	Medio alimentado
Después de 19 horas	monohidrato de glucosa 280 kg/460 l
Después de 43 horas	monohidrato de glucosa 280 kg/450 l
Después de 67 horas	monohidrato de glucosa 252 kg/390 l
Después de 91 horas	monohidrato de glucosa 252 kg/410 l
Después de 120 horas	monohidrato de glucosa 224 kg/370 l
Después de 140 horas	monohidrato de glucosa 168 kg/280 l
Después de 163 horas	monohidrato de glucosa 168 kg/270 l

- 5 Después de la terminación del cultivo, la solución de cultivo se esterilizó bajo condiciones de 120°C durante 20 min. A continuación, se recogieron células húmedas mediante un deshidratador continuo. Las células húmedas recogidas se secaron en una secadora de lecho fluidizado con vibración hasta un contenido de agua de 1% en peso. Las células secadas se transportaron mediante una máquina de transporte por aire hasta una zona de carga y, junto con nitrógeno gaseoso, se cargaron en una bolsa contenedora de aluminio que tenía un volumen de aproximadamente 1 m<sup>3</sup>. La parte abierta de la bolsa se termoselló, y la bolsa contenedora se almacenó en una nevera de 10°C o menos.
- 10 Las células secadas se extrajeron de la bolsa contenedora y se sometieron a extracción con hexano. La materia sólida se retiró de la solución de hexano mediante filtración. A continuación, el filtrado se calentó bajo presión reducida para eliminar el hexano para dar un aceite en bruto que comprendía ácido araquidónico como un ácido graso constituyente. El aceite en bruto se analizó. Como resultado, según se muestra en la Tabla 2, el aceite en bruto tenía un bajo contenido de esteroides de tipo éster.
- 15 Tabla 2: Encontrado para aceite en bruto que contiene ácido araquidónico

Ejemplo de referencia	Ejemplo de referencia 1 Condición 1-1	Ejemplo de referencia 2 Condición 1-2
Forma del depósito de cultivo, d/D	0,34	0,34
Valor de pH ajustado del medio A (antes de la esterilización)	6,3	4,5
Valor de pH ajustado del medio C (después de la esterilización y antes de la inoculación de la solución del cultivo de siembra)	6,3	6,3
% en peso de cada fracción		
Triglicérido	94,0%	94,2%
Materia no saponificable	2,0%	1,8%
Esterol de tipo éster	0,8%	0,6%
Ácido araquidónico en ácido graso total en aceite en bruto, %	42,0%	42,1%

Ejemplo de referencia 2: Producción de ácido araquidónico, d/D = 0,42, concentración de harina de soja en el medio = 6%

- 20 Se llevó a cabo un cultivo de siembra del mismo modo que en el Ejemplo de referencia 1. El cultivo principal se llevó a cabo bajo las mismas condiciones que en la condición (1-1) en el Ejemplo de referencia 1, excepto que la forma del depósito de cultivo era tal que se proporcionaban turbinas de seis álabes de d/D = 0,42 en tres fases diferentes y

se variaban las condiciones de pH para la preparación del medio. Para el cultivo bajo la condición (2-1), el medio A (antes de la esterilización) se ajustó hasta pH 6,1, y no se llevó a cabo ajuste del pH para el medio C (antes de la inoculación de la solución del cultivo de siembra). Para el cultivo bajo la condición (2-2), el medio A se ajustó hasta pH 4,5, y el medio C se ajustó hasta pH 6,1. Como resultado del cultivo, la concentración de ácido araquidónico producido por litro de solución de cultivo al final del cultivo era 19,0 g/l para la condición (2-1) y 19,7 g/l para la condición (2-2). Después de la terminación del cultivo, se obtuvo un aceite en bruto que comprendía ácido araquidónico como un ácido graso constituyente del mismo modo que en el Ejemplo de referencia 1. El aceite en bruto se analizó. Como resultado, según se muestra en la Tabla 3, el aceite en bruto tenía un bajo contenido de esteroides de tipo éster.

5

10 Tabla 3: Encontrado para aceite en bruto que contiene ácido araquidónico

Ejemplo de referencia	Ejemplo de referencia 2 Condición 2-1	Ejemplo de referencia 2 Condición 2-2
Forma del depósito de cultivo, d/D	0,42	0,42
Valor de pH ajustado del medio A (antes de la esterilización)	6,1	4,5
Valor de pH ajustado del medio C (después de la esterilización y antes de la inoculación de la solución del cultivo de siembra)	6,1	6,1
% en peso de cada fracción		
Triglicérido	94,2%	93,5%
Materia no saponificable	1,8%	1,8%
Esterol de tipo éster	0,6%	0,5%
Ácido araquidónico en ácido graso total en aceite en bruto, %	42,2%	41,3%

Ejemplo de referencia 3: Producción de ácido araquidónico, d/D = 0,3, 0,25 y 0,2, concentración de harina de soja en el medio = 6%

15

Se llevó a cabo un cultivo de siembra del mismo modo que en el Ejemplo de referencia 1. El cultivo principal se llevó a cabo bajo las mismas condiciones que en la condición (1-1) en el Ejemplo de referencia 1, excepto que, en lo referente a la forma del depósito de cultivo, se usaban un depósito provisto de turbinas de seis álabes de d/D = 0,3 en dos fases, un depósito provisto de turbinas de seis álabes de d/D = 0,25 en dos fases y un depósito provisto de turbinas de seis álabes de d/D = 0,2 en dos fases. Como resultado del cultivo, la concentración de ácido araquidónico producido por litro de solución de cultivo al final del cultivo era 17,0 g/l para el depósito de d/D = 0,30, 16,5 g/l para el depósito de d/D = 0,25 y 13,5 g/l para el depósito de d/D = 0,2. Después de la terminación del cultivo, se obtuvo un aceite en bruto que comprendía ácido araquidónico como un ácido graso constituyente del mismo modo que en el Ejemplo de referencia 1. El aceite en bruto se analizó. Como resultado, según se muestra en la Tabla 4, para todos los casos, el contenido de esteroides de tipo éster superaba 1%. A partir de la comparación de los resultados del Ejemplo de referencia 3 con los resultados de los Ejemplos de referencia 1 y 2, el alto contenido de esteroides de tipo éster se considera atribuible al depósito de cultivo con una baja relación d/D.

20

25

Tabla 4: Encontrado para aceite en bruto que contiene ácido araquidónico

Ejemplo de referencia o ejemplo de referencia de control	Ejemplo de referencia 3	Ejemplo de referencia 3	Ejemplo de referencia 3
Forma del depósito de cultivo, d/D	0,30	0,25	6,3
Valor de pH ajustado del medio A (antes de la esterilización)	6,3	6,3	6,3
Valor de pH ajustado del medio C (después de la esterilización y antes de la inoculación de la solución del cultivo de siembra)	6,3	6,3	6,3
% en peso de cada fracción			
Triglicérido	93,8%	93,1%	93,0%
Materia no saponificable	2,9%	2,9%	2,9%
Esterol de tipo éster	1,2%	1,2%	1,2%
Ácido araquidónico en ácido graso total en aceite en bruto, %	42,0%	41,6%	41,5%

Ejemplo de referencia 4: Producción de ácido araquidónico, d/D = 0,3, 0,25 y 0,2, concentración de harina de soja en el medio = 6%, esterilización a pH bajo

5 Se llevó a cabo un cultivo de siembra del mismo modo que en el Ejemplo de referencia 1. El ajuste del pH del medio en el cultivo principal se llevó a cabo del mismo modo que en la condición (1-2) en el Ejemplo de referencia 1 (medio A (pH 4,5) → esterilización → medio C (pH 6,3)). Posteriormente, el cultivo principal se llevó a cabo bajo tres condiciones en total, es decir, la condición 4-1 en la que se usaba un depósito provisto de turbinas de seis álabes de d/D = 0,3 en dos fases, la condición 4-2 en la que se usaba un depósito provisto de turbinas de seis álabes de d/D = 0,25 en dos fases y la condición 4-3 en la que se usaba un depósito provisto de turbinas de seis álabes de d/D = 0,2 en dos fases del mismo modo que en el Ejemplo de referencia 1. Además de los experimentos anteriores, se llevó a cabo un cultivo usando un depósito de d/D = 0,3 bajo dos condiciones adicionales tales que el medio A se ajustaba hasta pH 4,0 para la condición 4-4 y pH 4,9 para la condición 4-5.

10 Como resultado del cultivo principal, la concentración de ácido araquidónico producido por litro de solución de cultivo al final del cultivo era 17,2 g/l para la condición (4-1) [esterilización a pH 4,5, d/D = 0,30], 16,8 g/l para la condición (4-2) [esterilización a pH 4,5, d/D = 0,25], 14,0 g/l para la condición (4-3) [esterilización a pH 4,5, d/D = 0,20], 17,1 g/l para la condición (4-4) [esterilización a pH 4,0, d/D = 0,30] y 17,2 g/l para la condición (4-5) [esterilización a pH 4,9, d/D = 0,30]. Después de la terminación del cultivo, se repitió el procedimiento del Ejemplo de referencia 1 para dar un aceite en bruto que comprendía ácido araquidónico como un ácido graso constituyente.

15 Los resultados del análisis del aceite en bruto se muestran en la Tabla 5. Una comparación de los resultados del Ejemplo de referencia 3 con los resultados del Ejemplo de referencia 4 muestra que, en el depósito de cultivo de d/D = 0,30, la esterilización de la fuente de nitrógeno del medio a pH 4,5 podría reducir el contenido de esteroides de tipo éster hasta no más de 1%. Sin embargo, en el depósito de cultivo de d/D = 0,25 y el depósito de d/D = 0,20, a pesar de la esterilización de la fuente de nitrógeno a pH 4,5, el contenido de esteroides de tipo éster no se podía reducir hasta no más de 1%. Además, la comparación entre los resultados de las condiciones (4-1), (4-4) y (4-5) muestra que se considera que la esterilización de la fuente de nitrógeno a un pH en el intervalo de 4,0 a 4,9 proporciona resultados iguales de la reducción de esteroides de tipo éster.

25

Tabla 5: Encontrado para aceite en bruto que contiene ácido araquidónico

Ejemplo de referencia o ejemplo de referencia de control	Ejemplo de referencia 4 Condición 4-1	Ejemplo de referencia 4 Condición 4-2 (ejemplo de referencia de control)	Ejemplo de referencia 4 Condición 4-3 (ejemplo de referencia de control)	Ejemplo de referencia 4 Condición 4-1
Forma del depósito de cultivo, d/D	0,30	0,25	0,20	0,30
Valor de pH ajustado del medio A (antes de la esterilización)	4,5	4,5	4,5	4,0
Valor de pH ajustado del medio C (después de la esterilización y antes de la inoculación de la solución del cultivo de siembra)	6,3	6,3	6,3	6,3
% en peso de cada fracción				
Triglicérido	93,8%	93,1%	93,0%	93,4%
Materia no saponificable	2,2%	2,5%	2,7%	2,1%
Esterol de tipo éster	1,0%	1,1%	1,1%	1,0%
Ácido araquidónico en ácido graso total en aceite en bruto, %	42,0%	40,8%	40,8%	41,5%
				41,7%

Ejemplo de referencia 5: Resultados del análisis de grasa o aceite refinado proporcionado refinando aceite en bruto

5 Aceites en bruto que contenían ácido araquidónico preparados en la condición (1-1) en el Ejemplo de referencia 1 y la condición (2-1) en el Ejemplo de referencia 2 se refinaron mediante métodos de desoxidación y desgomado convencionales para dar grasa o aceite refinado 5-A y 5-B. El aceite en bruto que contenía ácido araquidónico bruto preparado en la condición  $d/D = 0,25$  en el Ejemplo de referencia 3 se refinó del mismo modo que se acaba de describir para dar grasa o aceite refinado 5-C. Los valores encontrados para la grasa o el aceite refinado que contiene ácido araquidónico se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6: Resultados del análisis del Ejemplo 5 (valores encontrados para grasa o aceite refinados que contiene ácido araquidónico A, B y C)

Ejemplo de referencia o ejemplo de referencia de control	Ejemplo de referencia 1 (Condición 1-1)	Ejemplo de referencia 2 (Condición 2-1)	Ejemplo de referencia 3 (d/D = 0,25) (Ejemplo de referencia de control)
Grasa o aceite refinado	5-A	5-B	5-C
% en peso de cada fracción			
Triglicérido	96,0%	96,4%	95,05
Materia no saponificable	1,4%	1,2%	2,0%
Esterol de tipo éster	0,8%	0,6%	1,2%
Ácido araquidónico en ácido graso total en grasa y aceite refinado, %	42,4%	42,8%	41,7%

Ejemplo de referencia 6: Producción de ácido araquidónico bajo la condición de 1,5% de harina de soja

Se proporcionó *Mortierella alpina* (CBS 754.68) y se llevó a cabo un cultivo de siembra (primera fase y segunda fase) del mismo modo que en el Ejemplo de referencia 1. Posteriormente, 4.500 l de un medio (medio A: harina de soja 84 kg, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 16,8 kg, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 2,8 kg, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 2,8 kg, aceite de soja 5,6 kg) se esterilizaron bajo condiciones de 121°C y 20 min. Se preparó medio C como otro medio esterilizando 1.000 l de un medio (medio B: monohidrato de glucosa 112 kg) bajo condiciones de 140°C durante 40 s y añadiendo el medio esterilizado al medio A anterior.

El medio C se ajustó hasta pH 6,1. A continuación, la solución del cultivo de siembra (segunda fase) se inoculó a los medios así preparados, y el volumen se ajustó hasta una cantidad inicial de solución de cultivo de 5.600 l en total (volumen del depósito de cultivo: 10 kl). Se comenzó un cultivo principal bajo condiciones de temperatura 26°C, caudal de aire 49 Nm<sup>3</sup>/h y presión interna 200 kPa. El cultivo principal se llevó a cabo en depósitos de cultivo principal, es decir, un depósito de cultivo provisto de turbinas de seis álabes de d/D (relación del diámetro del rotor de agitación (= d) al diámetro interno del depósito (= D)) = 0,34 en dos fases y un depósito de cultivo provisto de turbinas de seis álabes de d/D = 0,25 en dos fases. Mientras se alimentaba un medio según se muestra en la Tabla 7, se llevó a cabo un cultivo principal durante 162 h. Al final del cultivo, la concentración de ácido araquidónico producido por litro de la solución de cultivo era 5,0 g/l para el depósito de d/D = 0,34 y 4,7 g/l para el depósito de d/D = 0,25.

Tabla 7: Alimentación de medio en el Ejemplo de referencia 6

Momento del cultivo principal	Medio alimentado
Después de 19 horas	monohidrato de glucosa 84 kg/200 l
Después de 43 horas	monohidrato de glucosa 84 kg/200 l
Después de 67 horas	monohidrato de glucosa 56 kg/120 l
Después de 91 horas	monohidrato de glucosa 56 kg/125 l

Después de la terminación del cultivo, del mismo modo que en el Ejemplo de referencia 1, se recogieron células secadas, seguido por extracción con hexano para dar un aceite en bruto que comprendía ácido araquidónico como un ácido graso constituyente. Los valores encontrados para el aceite en bruto se muestran en la Tabla 8. Cuando la concentración de una fuente de nitrógeno en el medio era 1,5%, tanto para d/D = 0,25 como para d/D = 0,34, el aceite en bruto tenía un contenido de esteroides de tipo éster de no más de 1%.

Tabla 8: Resultados del Ejemplo de referencia 6 (valores encontrados para aceite en bruto que contiene ácido araquidónico)

Forma del depósito de cultivo, d/D	0,25	0,34
% en peso de cada fracción		
Triglicérido	94,1%	93,0%
Materia no saponificable	1,2%	1,2%
Esterol de tipo éster	0,4%	0,4%
Ácido araquidónico en ácido graso total en aceite en bruto, %	40,8%	41,5%

Ejemplo 1: Producción de ácido dihomo- $\gamma$ -linoléico; influencia de d/D = 0,30, 0,34 y 0,25, concentración de harina de soja en el medio 4%, y esterilización de la fuente de nitrógeno pH 4,5

Los presentes inventores han establecido un procedimiento de producción de una grasa o un aceite (triglicérido) que comprende ácido dihomo- $\gamma$ -linoléico como un ácido graso constituyente. La grasa o el aceite se puede producir cultivando microorganismos que tienen una capacidad productora de ácido araquidónico y una actividad de insaturación  $\Delta 5$  disminuida, por ejemplo, una cepa mutante de *Mortierella alpina* SAM 1860 (FERM P-3589) según el procedimiento de producción descrito en la Publicación de Patente Japonesa No Examinada (Kokai) N° 5 (1993)-91887. Se proporcionó *Mortierella alpina* (SAM 1860) como un hongo productor de ácido dihomo- $\gamma$ -linoléico. Una cepa estándar de *Mortierella alpina* se inoculó en un medio (extracto de levadura al 1%, glucosa al 2%, pH 6,3) en una cantidad de 100 ml contenida en un matraz Erlenmeyer de 500 ml. Se comenzó un cultivo de siembra (primera

fase) bajo condiciones de oscilación alternativa a 100 rpm y una temperatura de 28°C, y el cultivo de siembra se continuó durante 3 días. Posteriormente, se prepararon 30 l de un medio (extracto de levadura al 1%, glucosa al 2%, aceite de soja al 0,1%, pH 6,3) en un depósito de cultivo de aireación-agitación de 50 l. La solución del cultivo de siembra (primera fase) se inoculó al medio. Se inició un cultivo de siembra (segunda fase) bajo condiciones de velocidad de agitación 200 rpm, temperatura 28°C y presión interna del depósito 150 kPa, y el cultivo de siembra se continuó durante 2 días. El cultivo principal se llevó a cabo a cuatro niveles de condiciones (7-1) a (7-4).

Para la condición (7-1), 4.500 l de un medio (medio A: harina de soja 224 kg, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 16,8 kg, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 2,8 kg, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 2,8 kg, aceite de soja 5,6 kg) se ajustaron hasta pH 6,1 mediante la adición de una solución acuosa de hidróxido sódico, y a continuación el medio se esterilizó bajo condiciones de 121°C y 20 min. Se preparó medio C como otro medio esterilizando 1.000 l de un medio (medio B: monohidrato de glucosa 112 kg) bajo condiciones de 140°C durante 40 s y añadiendo el medio esterilizado al medio A anterior. Se midió el pH del medio C y se encontró que era pH 6,1. A continuación, la solución del cultivo de siembra (segunda fase) se inoculó en medio C y el volumen se ajustó hasta una cantidad inicial de solución de cultivo de 5.600 l en total (volumen del depósito de cultivo: 10 kl). Se inició el cultivo bajo condiciones de temperatura 26°C, caudal de aire 49 Nm<sup>3</sup>/h y presión interna 200 kPa.

La forma del depósito de cultivo era tal que se proporcionaban turbinas de seis álabes en dos fases y la relación del diámetro del rotor de agitación (= d) al diámetro interno del depósito (= D) era d/D = 0,34. Se detectó formación de espuma durante el cultivo con un sensor contra la formación de espuma, y se añadió automáticamente un aceite de soja para evitar que la solución de cultivo se descargara del depósito por la formación de espuma. Mientras se alimentaba un medio según se muestra en la Tabla 9, se llevó a cabo un cultivo principal durante 288 h. Al final del cultivo, la cantidad de la solución de cultivo era 7.600 l debido a la influencia de un incremento en la cantidad de la solución por la alimentación del medio y una disminución en la cantidad de la solución por evaporación de la solución.

Para la condición (7-2), el cultivo principal se llevó a cabo del mismo modo que en la condición (7-1), excepto que el medio A se ajustó hasta pH 4,5 mediante la adición no aséptica de ácido sulfúrico, el medio C se ajustó hasta pH 6,1 mediante la adición aséptica de una solución acuosa de hidróxido sódico y se usó un depósito de cultivo de d/D = 0,3. Para la condición (7-3), el cultivo se llevó a cabo del mismo modo que en la condición (7-1), excepto que se usó un depósito de cultivo de d/D = 0,30. Para la condición (7-4), el cultivo se llevó a cabo del mismo modo que en la condición (7-1), excepto que se usó un depósito de cultivo de d/D = 0,25. La concentración de ácido dihomo-γ-linolénico producido por litro de la solución de cultivo al final del cultivo era 12,3 g/l tanto para la condición (7-1) como para la condición (7-2), era 11,0 g/l para la condición (7-3) y era 10,0 g/l para la condición (7-4).

Tabla 9: Alimentación de medio en el Ejemplo 1

Momento del cultivo principal	Medio alimentado
Después de 19 horas	monohidrato de glucosa 280 kg/460 l
Después de 43 horas	monohidrato de glucosa 280 kg/450 l
Después de 67 horas	monohidrato de glucosa 280 kg/450 l
Después de 120 horas	monohidrato de glucosa 336 kg/530 l

Después de la terminación del cultivo, la solución de cultivo se esterilizó bajo condiciones de 120°C durante 20 min. A continuación, se recogieron células húmedas mediante un deshidratador continuo. Las células húmedas recogidas se secaron en una secadora de lecho fluidizado con vibración hasta un contenido de agua de 1% en peso. Las células secadas se transportaron mediante una máquina de transporte por aire hasta una zona de carga y, junto con nitrógeno gaseoso, se cargaron en una bolsa contenedora de aluminio que tenía un volumen de aproximadamente 1 m<sup>3</sup>. La parte abierta de la bolsa se termoselló, y la bolsa contenedora se almacenó en una nevera de 10°C o menos.

Las células secadas se extrajeron de la bolsa contenedora y se sometieron a extracción con hexano. La materia sólida se retiró de la solución de hexano mediante filtración. A continuación, el filtrado se calentó bajo presión reducida para eliminar el hexano para dar un aceite en bruto que comprendía ácido dihomo-γ-linolénico como un ácido graso constituyente. El aceite en bruto se analizó, y los resultados del análisis se muestran en la Tabla 10. Para el depósito de cultivo de d/D = 0,34, el aceite en bruto tenía un contenido de esteroides de tipo éster de no más de 1%. Para el depósito de cultivo de d/D = 0,3, el ajuste del pH bajo la condición (7-3) mediante el método convencional proporcionaba un aceite en bruto que tenía un alto contenido de esteroides de tipo éster. La esterilización de la fuente de nitrógeno del medio a pH 4,5 como en la condición (7-2) disminuía el contenido de esteroides de tipo éster hasta no más de 1%. Para el depósito de cultivo de d/D = 0,25, el contenido de esteroides de tipo éster superaba 1%.

Tabla 10: Valores encontrados para aceite en bruto que contiene ácido dihomo-γ-linolénico

Ejemplo de referencia o ejemplo de control	Ejemplo 1 Condición 7-1	Ejemplo 1 Condición 7-2	Ejemplo 1 Condición 7-3 (ejemplo de control)	Ejemplo 1 Condición 7-4 (ejemplo de control)
Forma del depósito de cultivo, d/D	0,34	0,30	0,30	0,25
Valor de pH ajustado del medio A (antes de la esterilización)	6,1	4,5	6,1	6,1
Valor de pH del medio C (después de la esterilización y antes de la inoculación de la solución del cultivo de siembra)	6,1	6,1	6,1	6,1
% en peso de cada fracción				
Triglicérido	93,8%	94,1%	93,5%	93,0%
Materia no saponificable	2,1%	2,2%	2,9%	2,9%
Esterol de tipo éster	0,9%	1,0%	1,2%	1,2%
Ácido dihomo-γ-linolénico en ácido graso total en aceite en bruto, %	42,2%	41,9%	40,7%	41,7%

Ejemplo 2: Producción de ácido dihomo- $\gamma$ -linolénico; cultivo bajo una concentración de harina de soja 1,5%

Se proporcionó *Mortierella alpina* (SAM 1860) y se llevó a cabo un cultivo de siembra del mismo modo que en el Ejemplo 7. Posteriormente, 4.500 l de un medio (medio A: harina de soja 84 kg,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  16,8 kg,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  2,8 kg,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2,8 kg, aceite de soja 5,6 kg) se esterilizaron bajo condiciones de 121°C y 20 min. Se preparó medio C como otro medio esterilizando 1.000 l de un medio (medio B: monohidrato de glucosa 112 kg) bajo condiciones de 140°C durante 40 s y añadiendo el medio esterilizado al medio A anterior. El medio C se ajustó hasta pH 6,1, y a continuación la solución del cultivo de siembra se inoculó en el medio C y el volumen se ajustó hasta una cantidad inicial de solución de cultivo de 5.600 l en total (volumen del depósito de cultivo: 10 kl).

El cultivo se inició bajo condiciones de temperatura 26°C, caudal de aire 49  $\text{Nm}^3/\text{h}$  y presión interna 200 kPa. En cuanto a la forma del depósito de cultivo, se usaron un depósito de cultivo provisto de turbinas de seis álabes de  $d/D$  (la relación del diámetro del rotor de agitación (= d) al diámetro interno del depósito (= D)) = 0,34 en dos fases y un depósito de cultivo provisto de turbinas de seis álabes de  $d/D = 0,25$  en dos fases. Se detectó formación de espuma con un sensor contra la formación de espuma, y se añadió automáticamente un aceite de soja para evitar que la solución de cultivo se descargara del depósito por la formación de espuma. Mientras se alimentaba un medio según se muestra en la Tabla 11, se llevó a un cabo un cultivo principal durante 162 h. Al final del cultivo, la concentración de ácido dihomo- $\gamma$ -linolénico producido por litro de la solución de cultivo era 4,8 g/l para el depósito de  $d/D = 0,34$  y era 4,7 g/l para el depósito de  $d/D = 0,25$ .

Tabla 11: Alimentación de medio en el Ejemplo 2

Momento del cultivo principal	Medio alimentado
Después de 19 horas	monohidrato de glucosa 84 kg/200 l
Después de 43 horas	monohidrato de glucosa 84 kg/200 l
Después de 67 horas	monohidrato de glucosa 84 kg/120 l
Después de 91 horas	monohidrato de glucosa 84 kg/125 l

Después de la terminación del cultivo, del mismo modo que en el Ejemplo 1, se recogieron células secadas, seguido por extracción con hexano para dar un aceite en bruto que comprendía ácido dihomo- $\gamma$ -linolénico como un ácido graso constituyente. El aceite en bruto se analizó, y los valores encontrados para el aceite en bruto se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12: Resultados del Ejemplo 2 (valores encontrados para aceite en bruto que contiene ácido dihomo- $\gamma$ -linolénico)

Forma del depósito de cultivo, $d/D$	0,25	0,34
% en peso de cada fracción		
Triglicérido	3,5%	93,0%
Materia no saponificable	1,2%	1,2%
Esterol de tipo éster	0,4%	0,4%
Ácido dihomo- $\gamma$ -linolénico en ácido graso total en aceite en bruto, %	40,5%	41,3%

Ejemplo 3: Producción de ácido de Mead;  $d/D = 0,5$ , concentración de harina de soja en el medio 4%

Los presentes inventores han establecido un procedimiento de producción de una grasa o un aceite (triglicérido) que comprende un ácido graso altamente insaturado  $\omega_9$  como un ácido graso constituyente. La grasa o el aceite se puede producir cultivando microorganismos que tienen capacidad productora de ácidos grasos altamente insaturados  $\omega_9$ , por ejemplo, una cepa mutante de *Mortierella alpina* (SAM 1861) (FERM P-3590) según el procedimiento de producción descrito en la Publicación de Patente Japonesa No Examinada (Kokai) N° 5 (1993)-91888.

Los presentes inventores también han establecido un procedimiento de producción de una grasa o un aceite (triglicérido) que comprende un ácido de Mead como un ácido graso constituyente. Esta grasa o aceite se produce sometiendo un microorganismo capaz de producir ácido araquidónico a un tratamiento de mutación según el método

descrito en la Publicación de Patente Japonesa No Examinada (Kokai) N° 10 (1998)-57085. La grasa o el aceite se puede producir cultivando una cepa mutante que tiene  $\Delta 12$  desaturasa rebajada o suprimida y al menos una actividad potenciada de actividad de desaturación en  $\Delta 5$ , actividad de desaturación en  $\Delta 6$  y/o actividad de extensión de la cadena, por ejemplo, *Mortierella alpina* (SAM 2086) (FERM P-15766).

- 5 Se proporcionó *Mortierella alpina* (SAM 2086) como un hongo productor de ácido de Mead. Una cepa estándar de *Mortierella alpina* se inoculó en un medio (extracto de levadura al 1%, glucosa al 2%, pH 6,3) en una cantidad de 500 ml contenida en un matraz Erlenmeyer de 2.000 ml. Se inició un cultivo de siembra (primera fase) bajo condiciones de oscilación alternativa a 100 rpm y una temperatura de 28°C, y el cultivo de siembra se continuó durante 3 días. Posteriormente, se prepararon 30 l de un medio (extracto de levadura al 1%, glucosa al 2%, aceite de oliva al 0,1%, pH 6,3) en un depósito de cultivo de aireación-agitación con un volumen de 50 l. La solución del cultivo de siembra (primera fase) se inoculó en el medio. Se inició un cultivo de siembra (segunda fase) bajo condiciones de velocidad de agitación 300 rpm, temperatura 28°C y presión interna del depósito 200 kPa, y el cultivo de siembra se continuó durante 2 días. Posteriormente, 3.200 l de un medio (medio A: harina de soja 160 kg, aceite de oliva 4 kg) se esterilizaron a 121°C durante 20 min.
- 10
- 15 Se preparó medio C como otro medio esterilizando 700 l de un medio (medio B: monohidrato de glucosa 80 kg) bajo condiciones de 140°C durante 90 s y añadiendo el medio esterilizado al medio A anterior. El medio C se ajustó hasta pH 6,1 y a continuación se inoculó solución de cultivo de siembra (segunda fase) al medio C, y el volumen se ajustó hasta una cantidad inicial de solución de cultivo de 4.000 l en total (volumen del depósito de cultivo: 10 kl). Se inició un cultivo principal bajo condiciones de temperatura 24°C, caudal de aire 49 Nm<sup>3</sup>/h, presión interna 200 kPa y demanda de energía de agitación 2 kW. El 4º día del cultivo, la temperatura se cambió hasta 20°C. En cuanto a la forma del depósito de cultivo, se usó un depósito de cultivo provisto de turbinas de seis álabes de d/D (la relación del diámetro del rotor de agitación (= d) al diámetro interno del depósito (= D)) = 0,5 en dos fases. Mientras se alimentaba un medio según se muestra en la Tabla 13, se llevaba a cabo el cultivo principal durante 456 h. Al final del cultivo, la concentración de ácido de Mead producido por litro de la solución de cultivo era 10,1 g/l.
- 20
- 25 Tabla 13: Alimentación de medio en el Ejemplo 3

Momento del cultivo principal	Medio alimentado
Después de 19 horas	monohidrato de glucosa 160 kg/280 l
Después de 43 horas	monohidrato de glucosa 160 kg/280 l
Después de 67 horas	monohidrato de glucosa 120 kg/210 l
Después de 91 horas	monohidrato de glucosa 120 kg/210 l
Después de 144 horas	monohidrato de glucosa 80 kg/140 l

- Después de la terminación del cultivo, la solución de cultivo se esterilizó bajo condiciones de 120°C durante 20 min. A continuación, se recogieron células húmedas mediante un deshidratador continuo. Las células húmedas recogidas se secaron en una secadora de lecho fluidizado con vibración hasta un contenido de agua de 1% en peso. Las células secadas, junto con nitrógeno gaseoso, se cargaron en una bolsa contenedora de tipo carga mediante una máquina de transporte por aire. La parte abierta de la bolsa se termoselló y a continuación la bolsa contenedora se almacenó, en una nevera, a 10°C o menos.
- 30

- Las células secadas se extrajeron de la bolsa contenedora y se sometieron a extracción con hexano. La materia sólida se retiró de la solución de hexano mediante filtración. A continuación, el filtrado se calentó bajo presión reducida para eliminar el hexano para dar un aceite en bruto que contenía ácido de Meade. El aceite en bruto se analizó y los resultados se muestran en la Tabla 14.
- 35

Ejemplo comparativo 1: Producción de ácido de Mead, d/D = 0,25, concentración de harina de soja en el medio = 4%

- Se llevó a cabo un cultivo de siembra del mismo modo que en el Ejemplo 3. Se llevó a cabo un cultivo principal bajo las mismas condiciones que en el Ejemplo 3, excepto que, en cuanto a la forma del depósito de cultivo, se usaba un depósito provisto de turbinas de seis álabes de d/D = 0,25 en dos fases. Como resultado, la concentración de ácido de Mead producido por litro de la solución de cultivo al final del cultivo era 8,0 g/l. Después de la terminación del cultivo, se obtenía un aceite en bruto que comprendía ácido de Mead como un ácido graso constituyente del mismo modo que en el Ejemplo 3.
- 40

- El aceite en bruto que contenía ácido de Mead se analizó, y los valores encontrados para el aceite en bruto se muestran en la Tabla 14.
- 45

Tabla 14: Valores encontrados para aceite en bruto que contiene ácido de Mead

Ejemplo o ejemplo de control	Ejemplo 3	Ejemplo Comparativo 1 (Ejemplo de Control)
Forma del depósito de cultivo, d/D	0,5	0,25
% en peso de cada fracción		
Triglicérido	94,6%	93,0%
Materia no saponificable	1,8%	2,8%
Esterol de tipo éster	0,6%	1,2%
Ácido de Mead en ácido graso total en aceite en bruto, %	35,0%	30,6%

Ejemplo 4: Producción de ácido de Mead, cultivo bajo la condición de concentración de harina de soja = 1,5%

5 Se proporcionó *Mortierella alpina* (SAM 2086), y se llevó a cabo un cultivo de siembra del mismo modo que en el Ejemplo 3. Posteriormente, 3.200 l de un medio (medio A: harina de soja 60 kg, aceite de oliva 4 kg) se esterilizaron bajo las condiciones de 121°C durante 20 min. Se preparó medio C como otro medio esterilizando 700 l de un medio (medio B: monohidrato de glucosa 80 kg) bajo condiciones de 140°C durante 90 s y añadiendo el medio esterilizado al medio A anterior. El medio C se ajustó hasta pH 6,1, y a continuación la solución del cultivo de siembra se inoculó al medio C, y el volumen se ajustó hasta una cantidad inicial de solución de cultivo de 4.000 l en total (volumen del depósito de cultivo: 10 kl). Se inició un cultivo principal bajo condiciones de temperatura 24°C, caudal de aire 49 Nm<sup>3</sup>/h, presión interna 200 kPa y demanda de energía de agitación 2 kW.

10 El 4º día del cultivo, la temperatura se cambió hasta 20°C. En cuanto a la forma del depósito de cultivo, se usaron un depósito de cultivo provisto de turbinas de seis álabes de d/D (la relación del diámetro del rotor de agitación (= d) al diámetro interno del depósito (= D)) = 0,34 en dos fases y un depósito de cultivo provisto de turbinas de seis álabes de d/D = 0,25 en dos fases. Mientras se alimentaba un medio según se muestra en la Tabla 15, se llevaba a cabo el cultivo principal durante 300 h. Al final del cultivo, la concentración de ácido de Mead producido por litro de la solución de cultivo era 3,9 g/l para el depósito de d/D = 0,34 y era 3,8 g/l para el depósito de d/D = 0,25.

Tabla 15: Alimentación del medio en el Ejemplo 4

Momento del cultivo principal	Medio alimentado
Después de 19 horas	monohidrato de glucosa 60 kg/120 l
Después de 43 horas	monohidrato de glucosa 60 kg/120 l
Después de 67 horas	monohidrato de glucosa 40 kg/80 l
Después de 91 horas	monohidrato de glucosa 40 kg/80 l

20 Después de la terminación del cultivo, del mismo modo que en el Ejemplo 3, se recogieron células secadas, seguido por extracción con hexano para dar un aceite en bruto que comprendía ácido de Mead como un ácido graso constituyente. El aceite en bruto se analizó, y los valores encontrados para el aceite en bruto se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16: Resultados del Ejemplo 4 (valores encontrados para aceite en bruto que contiene ácido de Mead)

Forma del depósito de cultivo, d/D	0,25	0,34
% en peso de cada fracción		
Triglicérido	95,0%	95,1%
Materia no saponificable	1,3%	1,3%
Esterol de tipo éster	0,5%	0,5%
Ácido de Mead en ácido graso total en aceite en bruto, %	34,5%	34,2%

Ejemplo de referencia 7: Preparación de una cápsula combinada con grasa o aceite (triglicérido) refinado que comprende ácido araquidónico como ácido graso constituyente y que tiene un contenido de esteroides de tipo éster rebajado

Se añadió agua a 100 partes en peso de gelatina y 35 partes en peso de glicerina comestible, y la mezcla se calentó a de 50 a 60°C para la disolución para preparar una película de gelatina. Posteriormente, una mezcla de la grasa o el aceite refinado 5-A (triglicérido) que tiene un contenido de esteroides de tipo éster rebajado y que comprende ácido araquidónico como un ácido graso constituyente preparado en el Ejemplo de referencia 5 con 0,05% de un aceite de vitamina E se proporcionó como contenido de cápsulas. La formación y el secado de las cápsulas se llevaron a cabo mediante un método convencional para preparar cápsulas blandas que contenían 180 mg de contenido por cápsula. También se prepararon cápsulas blandas usando como una materia prima la grasa o el aceite 5-B refinado, preparado en el Ejemplo de referencia 5, del mismo modo que en la preparación de cápsulas usando la grasa o el aceite refinado 5-A.

Ejemplo de referencia 8: Uso en una preparación grasa para transfusiones

Se añadieron y se dispersaron en un homogeneizador 400 g de la grasa o el aceite refinado 5-A (triglicérido) que tiene un contenido de esteroides de tipo éster rebajado y que comprende ácido araquidónico como un ácido graso constituyente preparado en el Ejemplo de referencia 5, 48 g de lecitina de yema de huevo refinada, 20 g de ácido oleico, 100 g de glicerina y 40 ml de sosa cáustica 0,1 N. A continuación, se añadió a la dispersión agua destilada para inyecciones para llevar el volumen de la dispersión hasta 4 litros, seguido por emulsionamiento con una máquina de emulsionamiento por atomización a alta presión para preparar una emulsión lipídica. Se distribuyeron en bolsas de plástico partes alícuotas de 200 ml de la emulsión lipídica, y a continuación se llevó a cabo esterilización con vapor de agua a alta presión a 121°C durante 20 min. para elaborar preparaciones grasas para transfusiones. Además, se preparó una preparación grasa para transfusiones usando como una materia prima la grasa o el aceite 5-B refinado preparado en el Ejemplo de referencia 5, del mismo modo que en la elaboración de la preparación grasa para transfusiones que usaba la grasa o el aceite refinado 5-A.

Ejemplo de referencia 9: Uso en un zumo

Se añadieron 2 g de  $\beta$ -ciclodextrina a 20 ml de una solución acuosa de etanol al 20%. 100 mg de la grasa o el aceite refinado 5-A (triglicérido), preparado en el Ejemplo de referencia 5, que tiene un contenido de esteroides de tipo éster rebajado y que comprende ácido araquidónico como un ácido graso constituyente (combinado con 0,05% de vitamina E) se añadió a esto con remoción por medio de una varilla, y la mezcla se incubó a 50°C durante 2 h. Después de enfriar hasta temperatura ambiente (alrededor de una h), la mezcla se incubó a 4°C durante 10 h adicionales con remoción.

El precipitado resultante se recogió mediante centrifugación, se lavó con n-hexano y a continuación se liofilizó para dar 1,8 g de un compuesto de inclusión de ciclodextrina que contenía triglicérido que contenía ácido araquidónico. 1 g de este polvo se mezcló homogéneamente en 10 l de zumo para preparar zumo que contenía una grasa o un aceite (triglicérido) refinado que tenía un contenido de esteroides de tipo éster rebajado y que comprendía ácido araquidónico como un ácido graso constituyente. También se preparó zumo que usaba como una materia prima la grasa o el aceite refinado 5-B preparado en el Ejemplo de referencia 5 del mismo modo que en la preparación del zumo que usaba la grasa o el aceite refinado 5-A.

Ejemplo de referencia 10: Uso en leche en polvo

Se mezclaron 0,3 g de la grasa o el aceite refinado 5-A (triglicérido), preparado en el Ejemplo de referencia 5, que tenía un contenido de esteroides de tipo éster rebajado y que comprendía ácido araquidónico como un ácido graso constituyente en 100 g de leche en polvo para preparar leche de inicio en polvo. Además, también se preparó leche de inicio en polvo que usaba como una materia prima la grasa o el aceite refinado 5-B preparado en el Ejemplo de referencia 5, del mismo modo que en la preparación de la leche de inicio en polvo que usaba la grasa o el aceite refinado 5-A.

Ejemplo de referencia 11: Método de cultivo que usa diversas cepas

5 Se usaron *Mortierella elongata* (IFO 8570), *Mortierella hygrophila* (IFO 5941), *Echinosporangium transversale* (NRRL 3116), *Conidiobolus nanodes* (CBS 154.56) y *Saprolegnia lapponica* (CBS 284.38) como hongos productores de ácido araquidónico. Cepas estándar de estos hongos productores de ácido araquidónico se inocularon en un medio (extracto de levadura 1%, glucosa 2%, pH 6,3), y se llevó a cabo un cultivo de siembra durante 3 días bajo condiciones de oscilación alternativa a 100 rpm y una temperatura de 28°C.

10 Posteriormente, se prepararon 25 l de un medio (glucosa 500 g, harina de soja 775 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 g,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  7,5 g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  7,5 g y aceite de soja 25 g, pH 6,3) en un depósito de cultivo de aireación-agitación de 50 l de volumen. La solución del cultivo de siembra se inoculó en el medio, y se inició un cultivo principal bajo condiciones de velocidad de agitación de 200 rpm, temperatura 28°C y presión interna del depósito 150 kPa. En cuanto a la forma del depósito de cultivo, se usaba un depósito de cultivo provisto de turbinas de seis álabes de  $d/D = 0,42$  en dos fases. El cultivo se llevó a cabo durante 186 h mientras se añadía una solución de glucosa al 50% a intervalos de aproximadamente 24 h de modo que se llevaba la concentración de glucosa hasta aproximadamente de 1 a 2%.

15 Después de la terminación del cultivo, la solución de cultivo se esterilizó bajo condiciones de 120°C y 20 min. Se recogieron células húmedas mediante filtración bajo presión reducida y se secaron hasta un contenido de agua de 1% en peso. Las células secadas se extrajeron con hexano. La materia sólida se retiró de la solución de hexano mediante filtración. A continuación, el filtrado se calentó bajo presión reducida para eliminar el hexano para dar un aceite en bruto que comprendía ácido araquidónico como un ácido graso constituyente. El aceite en bruto que contenía ácido araquidónico se analizó. Valores encontrados para el aceite en bruto se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17: Resultados del Ejemplo de referencia 11 (valores encontrados para aceite en bruto que contiene ácido araquidónico)

Cepa	M. elongata IFO 8570	M. hygrophila IFO 5941	E. transversale NRRL 3116	C. nanodes CBS 154.56	S. lapponica CBS 284.38
% en peso de cada fracción					
Triglicérido	90,0%	88,1%	86,0%	83,4%	82,6%
Materia no saponificable	1,9%	1,9%	2,0%	2,0%	2,0%
Esterol de tipo éster	0,8%	0,7%	0,7%	0,8%	0,8%
Ácido araquidónico en ácido graso total en aceite en bruto, %	30,8%	31,7%	28,6%	26,3%	20,7%

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un aceite microbiano en bruto que comprende una grasa o un aceite que comprende un ácido graso altamente insaturado como un ácido graso constituyente, siendo dicho ácido graso altamente insaturado ácido dihomo- $\gamma$ -linolénico (20:3  $\omega$ 6) o ácido 5,8,11-eicosatrienoico (ácido de Mead: 20:3  $\omega$ 9), siendo el contenido de dicho ácido graso altamente insaturado, basándose en el ácido graso total en el aceite en bruto, no menor de 30% en peso, caracterizado por que el contenido de esteroides de tipo éster de la grasa o el aceite no es mayor de 1,0% en peso.
2. Un aceite microbiano en bruto según la reivindicación 1, que tiene un contenido de esteroides de tipo éster no mayor de 0,6% en peso.
- 10 3. Un aceite microbiano en bruto según la reivindicación 1 o 2, en el que el contenido de materia no saponificable de la grasa o el aceite no es mayor de 2,0% en peso.
4. Un aceite microbiano en bruto según la reivindicación 1, que tiene un contenido de materia no saponificable de no más de 1,8% en peso.
- 15 5. Un aceite microbiano en bruto según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que no menos de 70% de la grasa o el aceite que comprende dicho ácido graso altamente insaturado como el ácido graso constituyente corresponde a triglicérido.
6. Un aceite microbiano en bruto según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es de un microorganismo perteneciente al género *Mortierella*, subgénero *Mortierella*.
7. Un procedimiento para producir una grasa o un aceite refinado, que comprende refinar un aceite microbiano en bruto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 20 8. Un procedimiento según la reivindicación 7, en el que dicho refinado es mediante desgomado, desoxidación, desodorización, decoloración, tratamiento en columna, destilación molecular o frigelización.
- 25 9. Un alimento y una bebida general, un alimento funcional, un complemento nutricional, una leche de inicio para prematuros, una leche de inicio para recién nacidos a término, un alimento para lactantes, un alimento para madres gestantes y lactantes o un alimento para ancianos, que comprende un aceite microbiano en bruto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 incorporado en el mismo.
- 30 10. Un alimento nutricional terapéutico que comprende un aceite microbiano en bruto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 incorporado en el mismo, opcionalmente junto con un vehículo neutro adecuado para la administración bucal, intrarrectal o parenteral.
11. Un alimento para animales o peces, que comprende un aceite microbiano en bruto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 incorporado en el mismo.
12. Una composición farmacéutica, que comprende un aceite microbiano en bruto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 incorporado en la misma, o preparada usando un aceite microbiano en bruto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 como una materia prima.