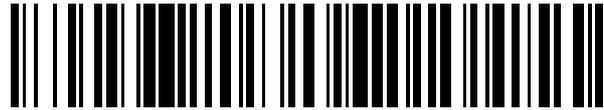


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 567 569**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/64** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2003 E 03740299 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.01.2016 EP 1513941**

54 Título: **Preparación de aceite microbiano que contiene ácidos grasos poliinsaturados**

30 Prioridad:

**19.06.2002 EP 02254262**

**18.12.2002 EP 02258713**

**26.02.2003 EP 03251169**

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

**25.04.2016**

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)**

**HET OVERLOON 1**

**6411 TE HEERLEN, NL**

72 Inventor/es:

**STREEKSTRA, HUGO y**

**BROCKEN, PÉTRUS JOSEPH MARIA**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 567 569 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

Preparación de aceite microbiano que contiene ácidos grasos poliinsaturados.

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de ácido araquidónico (ARA, por sus siglas en inglés), en un aceite microbiano, que comprende cultivar un microorganismo en un procedimiento de dos fases y recuperar con posterioridad el aceite microbiano de los microorganismos.

**Introducción**

10 Los ácidos grasos poliinsaturados, o los PUFA (por sus siglas en inglés), se encuentran en la naturaleza. Se produce una amplia variedad de diferentes PUFA por diferentes organismos celulares únicos (algas, hongos, etc.). Un PUFA importante en particular es el ácido araquidónico (ARA), uno de una serie de Ácidos Grasos Poliinsaturados de Cadena Larga (los LC-PUFA, por sus siglas en inglés). Químicamente, el ácido araquidónico es el ácido *cis*-5,8,11,14-eicosatetraenoico (20:4) y pertenece a la familia (n-6) de los LC-PUFA.

15 El ácido araquidónico es un precursor principal de una amplia variedad de compuestos biológicamente activos, conocidos colectivamente como eicosanoides, un grupo que comprende prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos. El ácido araquidónico es también uno de los componentes de la fracción lipídica de la leche materna humana y se piensa que es esencial para el desarrollo neurológico óptimo infantil. El ácido araquidónico presenta una amplia variedad de diferentes aplicaciones incluyendo el uso de fórmulas infantiles, productos alimenticios y alimentos para animales. El ácido araquidónico se puede producir usando microorganismos y en particular usando los hongos filamentosos *Mortierella*. Sin embargo, el porcentaje de ácido araquidónico en el aceite microbiano producido es normalmente demasiado bajo. Se han realizado una serie de intentos para intentar y aumentar el rendimiento de ácido araquidónico a partir de *Mortierella*, pero con grados variables de éxito. Muchos de los intentos para aumentar los niveles de ácido araquidónico han implicado etapas que no se pueden usar fácilmente en un marco industrial.

20 Por ejemplo, Eroshin *et al.*, Process Biochemistry: (35) 2.000, págs. 1.171-1.175 dejan reposar el cultivo durante un periodo de aproximadamente una semana después del final de la fermentación. Las cantidades de ARA mencionadas se basan en la biomasa (y no en aceite extraído de la misma) ya que este documento no describe la extracción de ningún aceite. Totani *et al.*, Industrial Applications of single cell oils, American Oil Chemists' Society Campaign, 1.992, Capítulo 4, págs. 52-60 y Lipids, vol. 22 N° 12 (1.987) páginas 1.060-1.062 defienden el uso de una temperatura de fermentación anormalmente baja, lo que significa que la fermentación se ralentiza considerablemente. El contenido en ARA aquí se basa en la extracción con una mezcla de disolventes cloroformo/metanol. Otro documento en el campo de producción de ARA es la patente internacional WO 96/21037.

25 La patente europea EP-A-1035211 (Suntory) describe un procedimiento para producir ARA y lípidos DHGLA de *M. alpina*. Sin embargo, el cálculo del contenido en ARA se basa en la biomasa (en vez de un aceite extraído de él) o resulta de un método analítico en el que se esterifican primero los ácidos grasos poliinsaturados y después se extraen usando un disolvente (en vez de ser extraídos primero, para producir un aceite, y determinándose después el contenido en ARA sobre la base de este aceite).

30 Un informe de un rendimiento mayor de ARA alega una concentración en micelio recogido de casi el 70% usando la cepa 1S-4 de *M. alpina* (Shimizu S., Oils-Fats-Lipids 1.995, Proc. World Congr. Int. Soc. Fat Res., 21° (1.996), Fecha del encuentro 1.995, Volumen 1, páginas 103-109 y Biophysical Research communications, Vol. 150 (1), 1.988, páginas 335-441). Sin embargo, este porcentaje se basa en las células y no es el mismo que el porcentaje de ARA en un aceite microbiano. De hecho, el aceite preparado sólo proporcionó un contenido en ARA de 39,0% (Tabla 27,2, página 105). (Obsérvese que la técnica usa una variedad de diferentes maneras para medir el contenido en ARA, que puede no ser necesariamente la misma unidad o estar basado en el mismo protocolo analítico que las cifras mencionadas más adelante en esta memoria descriptiva). Además, esto sólo se obtuvo cuando se permitió que las células de *M. alpina* reposaran a temperatura ambiente durante 6 días más después de la fermentación, que no es claramente una opción viable para procedimientos de producción industrial.

35 Hung-Der Jang, Yuh-Yih Lin y Shang-Shyng Vang, Bot. Bull. Acad. Sin. (2.000) vol. 41, páginas 41-48, describen la producción de ácido graso poliinsaturado con *Mortierella alpina* por fermentación de sustratos sólidos.

La patente internacional WO-A-9213086 describe métodos para la producción de ácido araquidónico.

40 A. Lindberg, G. Molin, Appl. Microbiol. Biotechnol. (1.993) vol. 39, páginas 450-455, describen el efecto de la temperatura y el suministro de glucosa sobre la producción de ácidos grasos poliinsaturados por el hongo *Mortierella alpina* CBS 343.66 en cultivos del fermentador.

H. Yamada *et al.*, Industrial Applications of Single Cell Oils, páginas 118-138 XP001000789 describen la producción de ácido dihomo- $\gamma$ -linolénico, ácido araquidónico y ácido eicosapentaenoico por Hongos filamentosos.

La patente internacional WO-A-9737032 describe la preparación de aceite que contiene ácido graso poliinsaturado

microbiano a partir de biomasa pasteurizada. Se describe un aceite microbiano que presenta un contenido en triglicéridos mayor que 90%.

La patente japonesa JP-A-2/13388 (Lion Corporation) describe un procedimiento de producción de un lípido que contiene ácido graso insaturado.

- 5 Higashiyama et al., JAOCS, vol. 75, N° 12 (1.988), páginas 1.815 a 1.819, describen los efectos de la adición mineral sobre la morfología del crecimiento de una producción de ácido araquidónico por *Mortierella alpina* 1S-4.

La patente japonesa JP-A-2/142486 (Lion Corporation) describe un procedimiento de producción de un lípido que contiene ácido graso insaturado.

- 10 Shinmen et al., Appl. Microbiol. and Biotechnol. (1.989), vol. 31, páginas 11 a 16, describen la producción de ácido araquidónico por hongos *Mortierella*.

La patente japonesa JP-A-64/38007 (Lion Corporation) describe un producto cosmético para la piel que contiene un lípido que contiene ácido araquidónico.

- 15 Hay, por lo tanto, una necesidad de identificar maneras de aumentar la proporción (y así el rendimiento) de ácido araquidónico en los aceites microbianos y en particular de una manera que se pueda emplear en una escala industrial.

### Sumario de la invención

- 20 La presente invención proporciona nuevos procedimientos para producir un aceite microbiano con una proporción aumentada de ácido araquidónico. Esto significa que el ácido araquidónico puede ser producido a un coste reducido y tasa aumentada. Además, como la presente invención no se basa en la modificación genética de los microorganismos implicados para aumentar la producción de ácido araquidónico, la invención puede ayudar a satisfacer la demanda creciente de ingredientes alimenticios no modificados genéticamente, naturales. Además, el aceite presenta bajo potencial de oxidación y así es adecuado para la incorporación a los alimentos humanos para los cuales es particularmente importante la toxicidad, tal como las fórmulas infantiles.

- 25 De acuerdo con esto, la invención se refiere a un procedimiento para la producción de un ácido microbiano que comprende al menos 40% de ácido araquidónico (ARA) basado en el aceite y que tiene un contenido en triglicéridos de al menos 90%. El procedimiento comprende fermentar (o cultivar) un microorganismo en el interior de un recipiente de fermentación, convenientemente en un medio de cultivo, según lo cual se añade una fuente de carbono durante la fermentación y según lo cual en una fase que precede inmediatamente al final de la fermentación y que empieza a partir de 15 a 2 horas antes del final de la fermentación la fuente de carbono es limitante de la tasa en el crecimiento de los microorganismos o se restringe de manera que los microorganismos metabolicen (su propia) grasa o grasas y/o lípido o lípidos y en los que el procedimiento comprende además extraer el aceite del microorganismo usando un disolvente no polar.

- 30 El aceite microbiano puede comprender al menos 50% (o al menos 50,5; 51 ó 52%) de ácido araquidónico (ARA). Puede tener hasta 55, 57 ó 60% de ARA. Este aceite tiene un contenido en triglicéridos de al menos 90%.

- 35 El aceite se puede extraer en hexano.

Se cree que una vez que la concentración de la fuente de carbono se reduce o se restringe, las células empiezan a metabolizar las grasas o lípidos en el interior de la célula. Sin embargo, las células consumen grasas distintas de ARA primero. De esta manera la proporción de ARA en las grasas o lípidos en las células aumenta. Por lo tanto, el procedimiento de la invención puede conducir, de esta manera, a un aceite de mayor contenido en ARA.

- 40 **Descripción detallada de la invención**

Microorganismos

- 45 Los microorganismos empleados pueden ser una bacteria, levadura, alga u hongo. Preferiblemente, se usa un hongo y en particular se usa un hongo filamentoso. Los hongos preferidos son del orden *Mucorales*. El hongo puede ser del género *Mortierella*, *Phycomyces*, *Entomophthora*, *Pythium*, *Thraustochytrium*, *Blakeslea*, *Rhizomucor* o *Aspergillus*. Los hongos preferidos son de la especie *Mortierella alpina*.

- 50 Las cepas de microorganismos usadas en la presente invención pueden ser una cepa que se encuentre en la naturaleza o cepa industrial usada comúnmente. La cepa puede no haber sido modificada genéticamente por ejemplo, puede no ser transformada con un vector ni poder contener gen o genes heterólogos. Dada la preferencia actual en algunas dependencias para productos alimenticios que no contengan ingredientes genéticamente logrados, el microorganismo empleado puede ser una cepa que no haya sido así modificada.

## Fermentación

5 La fermentación/cultivo se llevará a cabo típicamente en un fermentador adecuado (o recipiente de fermentación) que contenga un medio de cultivo (líquido, normalmente acuoso). Un recipiente de fermentador principal se inoculará normalmente de manera aséptica desde un pequeño fermentador de alimentación. Típicamente, se emplea un procedimiento de fermentación sumergida y/o aerobia. Esto puede tener lugar en un fermentador de tanque profundo. El fermentador puede estar provisto de dispositivos para controlar y/o cambiar el pH y la temperatura. El recipiente se puede adaptar adicionalmente para realizar o permitir que se lleve a cabo aireación y/o mezcla de las células y líquido, tal como agitación de la disolución. Esto puede ser agitando, por ejemplo conseguido usando medios mecánicos.

10 Convenientemente, el volumen del fermentador es al menos 10, 20, 40 o incluso 60 m<sup>3</sup>. Se pueden usar volúmenes tan altos como 100 o incluso 150 m<sup>3</sup>.

La fermentación durará típicamente durante 10 días o menos, preferiblemente 9 días o menos, más preferiblemente 8 días o menos. Puede ser al menos 4, 5, 6 ó 7 días.

15 Opcionalmente, la fermentación puede ser durante 150 a 200 horas, tal como 160 a 190 horas, por ej. de 170 a 180 horas. El final de la fermentación es normalmente el punto en el que se detiene la agitación y/o aireación. Esto puede ser cuando se apague (efectivamente) el recipiente del fermentador y/o equipo auxiliar. Los microorganismos pueden ser retirados después del fermentador.

La fermentación puede ser a una temperatura de desde 20 a 40°C.

Fuentes de carbono y nitrógeno.

20 Se puede usar cualquier medio adecuado en la fermentación, por ejemplo, un medio apropiado para el microorganismo que se esté usando. La fuente de carbono puede comprender (fuentes complejas tales como) maltodextrina, harina de avena, avena, melazas, aceite vegetal (por ejemplo, soja), extracto de malta, almidón, etanol o aceite de soja. Las fuentes de carbono preferidas (no complejas) incluyen carbohidratos o azúcares, tales como fructosa, maltosa, sacarosa, xilosa, manitol, glucosa o lactosa o glicerina (por ejemplo, a partir de una fuente vegetal), citrato, acetato, glicerol, etanol o ascorbato (por ejemplo, sódico). En una realización preferida de la invención, la fuente de carbono es o comprende glucosa y en particular es jarabe de glucosa.

25 Las fuentes de nitrógeno adecuadas incluyen extracto de levadura, urea y peptona. El medio puede excluir agar.

Las fuentes de nitrógeno y/o carbono preferidas son solubles en agua o miscibles en agua.

30 Los componentes individuales del medio (tales como las fuentes de nitrógeno y/o carbono) pueden estar presentes (todas) al principio de la fermentación, añadirse de manera continua durante la fermentación o añadirse etapa por etapa o en lotes. En particular, la cantidad de fuente de carbono presente en el medio se controlará típicamente como se describe a continuación, preferiblemente controlando la tasa de adición de la fuente de carbono.

35 Las fuentes de nitrógeno y/o carbono se pueden suministrar (o añadir) de manera separada o suministrar de manera simultánea o suministrar como una preparación combinada. Pueden presentarse así en la misma composición (si se cree necesario), que es preferiblemente un líquido. Las fuentes de carbono y/o nitrógeno se pueden añadir (al recipiente del fermentador) antes de que se añadan las células fúngicas (al recipiente), en otras palabras, previamente a inoculación o durante la fermentación alternativamente se pueden añadir tanto antes de la fermentación como durante.

Medio de cultivo

40 El medio de cultivo es preferiblemente un líquido acuoso. Este puede contener adicionalmente otras sustancias para ayudar a la fermentación, por ejemplo, un agente quelante (por ejemplo, ácido cítrico), un agente antiespumante (por ejemplo, aceite de soja), una vitamina (por ejemplo, tiamina y/o riboflavina), cualquier metal catalítico necesario (por ejemplo, metales alcalino-térreos tales como magnesio o calcio o cinc o hierro y/u otros metales tales como cobalto y cobre), fósforo (por ejemplo, fosfato) y/o azufre (por ejemplo, sulfato). El medio puede contener, si es necesario, un aceite de aditivo tal como aceite de oliva o de soja, sin embargo, preferiblemente el medio no contiene dicho aceite.

45 La temperatura de crecimiento (o fermentación) (óptima) puede variar dependiendo del microorganismo usado. Sin embargo, es preferiblemente de 20 a 40°C y más preferiblemente de 22 a 30 ó 32°C. En particular, la temperatura a la que la fermentación se lleva a cabo será  $\geq 22^\circ\text{C}$  o  $\leq 25^\circ\text{C}$ , por ejemplo, 22 a 30°C, tal como de 23-28°C. El pH del líquido acuoso durante la fermentación puede ser de 4 a 10, tal como de 5 a 8, óptimamente de 6 a 7.

50 El medio típicamente se agitará o removerá durante la fermentación para ayudar a facilitar la aireación. El líquido acuoso y las células se mezclan o se remueven convenientemente. Esto se puede conseguir si se proporciona aireación, tal como mediante burbujeo de un gas, por ejemplo, aire, en el líquido acuoso. Esto puede servir el fin adicional de proporcionar oxígeno a las células fúngicas: por lo tanto, la fermentación es preferiblemente una

aerobia. Otros medios de agitación o mezclamiento incluyen, por ejemplo, usar un impulsor. Este puede ser de un diseño de flujo axial de hidroala o se puede diseñar de manera que el medio acuoso se fuerce radialmente hacia el exterior desde el impulsor (tal como una turbina). Incluso aunque no haya agitación se prefiere que se proporcione oxígeno a las células microbianas durante la fermentación y así la aireación (por ejemplo, burbujeando aire, oxígeno u otro gas que contenga oxígeno) es ventajosa aquí. La aireación puede ser a de 0,1 a 2,0, tal como de 0,5 a 1,0 vvm.

Preferiblemente, el volumen del fermentador es al menos 2 ó 5 litros, preferiblemente al menos 10 litros. Sin embargo, para los fermentadores usados en la industria o en una escala industrial, el volumen del recipiente es preferiblemente al menos 50, 100, 500 ó 1.000 litros.

10 Última (o segunda) fase de la fermentación.

El procedimiento de fermentación se puede dividir en al menos dos fases. Una fase que precede inmediatamente al final de la fermentación, se caracteriza por una disminución en la cantidad de la fuente de carbono disponible para el microorganismo como se define en la reivindicación 1. Esta fase empieza de 15 a 2 horas antes del final de la fermentación, preferiblemente menos de o en 10 horas desde el final de la fermentación, más preferiblemente de 3 a 5 horas del final de la fermentación. Preferiblemente, esta fase empezará típicamente en menos de 10 días después del comienzo de la fermentación, más preferiblemente comenzará en menos de 9 días después, incluso más preferiblemente menos de 8 días después.

20 Durante una primera fase o fase más temprana de la fermentación la fuente de carbono puede estar en exceso. Así la cantidad de la fuente de carbono disponible puede no ser limitante para el crecimiento de los microorganismos. La tasa de adición de la fuente de carbono puede exceder de la tasa de su consumo por los microorganismos. En la segunda o última fase de la fermentación la cantidad de la fuente de carbono que se está añadiendo puede disminuir o detenerse completamente. Esto significa que la cantidad de fuente de carbono disponible para el microorganismo disminuirá durante la segunda o la última fase de la fermentación.

25 Típicamente, la concentración de la fuente de carbono durante la segunda fase es  $\leq 10$  g de la fuente de carbono/kg de medio, preferiblemente de 0,01 ó 0,1 a 8 ó 10 g/kg, más preferiblemente de 0,5 a 5 g/kg e incluso más preferiblemente de 1 ó 2 a 4 ó 5 g/kg. Esto significa que, de promedio durante la última fase de la fermentación, habrá  $\leq 0,30$  M de carbono por kg de medio, preferiblemente de 0,003 M a 0,3 M de carbono por kg. Ventajosamente, esto es de 0,015 M a 0,17 M de carbono por kg e incluso más preferiblemente de 0,03 M a 0,17 M de carbono por kg.

30 Cuando la fuente de carbono comprende glucosa, típicamente la concentración de glucosa (en la última fase) será de promedio  $\leq 10$  g /kg de medio, preferiblemente de 0,01 ó 0,1 a 8 ó 10 g/kg. Ventajosamente, esto es de 0,5 a 5 g/kg e incluso más preferiblemente de 1 ó 2 a 4 ó 5 g/kg de medio. En este sentido, el medio incluye las células y el medio de cultivo acuoso, es decir es el "caldo" (células y líquido circundante).

35 La tasa de adición de la fuente de carbono en la última fase es preferiblemente no mayor que 0,03 M de carbono por kg, preferiblemente no más de 0,025 o 0,02 M de carbono por /kg (medio). Preferiblemente, la tasa de adición es aproximadamente 0,015 M de carbono por/kg. Si la fuente de carbono es glucosa, entonces preferiblemente la tasa de adición de glucosa es menor que 1,0, por ejemplo, menor que 0,8, por ejemplo, menor que 0,5 g de glucosa por/kg de medio por hora.

40 Preferiblemente, la tasa de adición de la fuente de carbono en la última fase es aproximadamente la mitad de la tasa de consumo de la fuente de carbono por los microorganismos. Sin embargo, la relación de tasa de adición: tasa de consumo puede variar de 1:1-3, tal como de 1:1,5 a 2,5, óptimamente de 1:1,8 a 2,2. Alternativamente, la tasa de adición puede ser de 30-70%, tal como de 40 a 60%, óptimamente de 45 a 55%, de la tasa de consumo.

45 La concentración apropiada de la fuente de carbono durante la segunda fase de la fermentación se puede conseguir controlando cuidadosamente la tasa de adición de la fuente de carbono. Típicamente, esto se disminuirá como sea apropiado durante, o para precipitar el comienzo de, la última fase. El muestreo periódico y el análisis del cultivo se pueden usar para determinar la concentración de la fuente de carbono y realizar ajustes cuando sea necesario para la tasa de adición de la fuente de carbono. Esto se puede realizar automáticamente usando un sistema informático.

Procedimiento de pasteurización.

50 La pasteurización normalmente tendrá lugar después de que haya terminado la fermentación. En una realización preferida, la pasteurización acabará la fermentación, debido a que el calor durante la pasteurización destruirá las células. La pasteurización se puede realizar, por lo tanto, en el caldo de fermentación (o las células en el medio líquido (acuoso)), aunque se puede realizar en la biomasa microbiana obtenida del caldo. En el primer caso, la pasteurización puede tener lugar mientras las células microbianas están aún en el interior del fermentador. La pasteurización tiene lugar preferiblemente antes que cualquier tratamiento adicional de las células microbianas, por ejemplo, granulación (por ejemplo, por extrusión) desmenuzamiento o amasado.

Preferiblemente, el protocolo de pasteurización es suficiente para inhibir o inactivar una o más enzimas que puedan

afectar de manera perjudicial o degradar un PUFA o aceite microbiano, por ejemplo, una lipasa.

Una vez que ha terminado la fermentación, se puede filtrar el caldo de la fermentación o tratar de otro modo para retirar agua o líquido acuoso. Después de la eliminación del agua, se puede obtener una biomasa "torta". Si no ha tenido lugar pasteurización, entonces las células deshidratadas (o torta de biomasa) se pueden someter a pasteurización.

Extracción de aceite

Si es deseable, y por ejemplo después de que haya terminado la fermentación, los microorganismos pueden ser destruidos o pasteurizados. Esto puede ser para inactivar cualquier enzima no deseable, por ejemplo, las enzimas que podían degradar el aceite o reducir el rendimiento de los PUFA.

Después de que se ha completado o ha terminado el cultivo o la fermentación, el caldo de la fermentación (células y líquido acuoso) pueden ser retirados después del fermentador y si es necesario es retirado líquido (normalmente agua) de ahí. Se puede usar cualquier técnica de separación sólido-líquido adecuado. Esto (deshidratación) puede ser por centrifugación y/o filtración. Las células se pueden lavar, por ejemplo, usando una disolución acuosa (tal como agua) por ejemplo para retirar cualquier compuesto soluble en agua o dispersible en agua, extracelular. Se puede recuperar después un aceite de los microbios, de manera que el aceite se extrae en disolvente, preferiblemente se extrae en hexano.

El aceite puede no tener (o estar sustancialmente exento de) GLA y/o DGLA.

Procedimiento de extracción de PUFA

El aceite microbiano que contiene el ARA) puede ser extraído de gránulos (por ej. secos) (por ej., mezclas extruídas) que contienen las células. La extracción se lleva a cabo usando un disolvente no polar, por ejemplo, un alcano C<sub>1-8</sub>, por ej., C<sub>2-6</sub>, por ejemplo, hexano. Se puede usar dióxido de carbono (en una forma líquida, por ejemplo, en un estado supercrítico).

Preferiblemente, se permite que el disolvente se filtre por los gránulos secos. Las técnicas de granulación y extrusión de microorganismos adecuadas y la extracción posterior de un aceite que contiene PUFA microbiano, se describen en la patente internacional WO-A-97/37032.

El disolvente permite que se obtenga un aceite que contenga PUFA bruto. Este aceite se puede usar en ese estado, sin más tratamiento, o se puede someter a una o más etapas de refinado. Los protocolos de refinado adecuados se describen en la solicitud de Patente internacional nº PCT/EP01/08902. Por ejemplo, el aceite se puede someter a un tratamiento ácido o desgomado, tratamiento alcalino o eliminación de aceite graso libre, blanqueamiento o eliminación de pigmento, filtración, frigelización (o enfriamiento, por ejemplo, para eliminar triglicéridos saturados), desodorización (o eliminación de ácidos grasos libres) y/o clarificación (o eliminación de sustancias insolubles en aceite).

El aceite resultante es particularmente adecuado para fines nutricionales y se puede añadir a alimentos (humanos) o piensos (animales). Los ejemplos incluyen leche, fórmulas infantiles, bebidas saludables, pan y alimentación para animales.

Purificación/Refinado

El aceite microbiano puede ser refinado y purificado. Esto puede implicar eliminar uno o más de los siguientes componentes: un fosfolípido, metal traza, pigmento, carbohidrato, proteína, ácido graso libre (FFA, por sus siglas en inglés), sustancia insoluble en aceite, sustancia insoluble en agua, jabón o sustancia saponificada, producto de oxidación, azufre, mono- o diglicérido, producto de descomposición de pigmentos, disolvente y/o esterol. La purificación puede reducir o eliminar "sabores desagradables" y/o mejorar la estabilidad del aceite.

Para efectuar esto, el procedimiento (por ejemplo, purificación) puede comprender desgomado (o tratamiento ácido), neutralización (o tratamiento alcalino), lavado con agua, blanqueamiento, filtración, desodorización, clarificación y/o enfriamiento (o frigelización). Preferiblemente, la purificación comprende tratamiento con ácido y/o tratamiento alcalino (desgomado y neutralización). Alternativamente, los métodos de purificación pueden comprender blanqueamiento y/o desodorización. Preferiblemente, sin embargo, la purificación implicará blanqueamiento y/o desodorización y, óptimamente además tratamiento con ácido y/o álcali.

Aceites

Preferiblemente, el aceite microbiano comprende de 50, 55 ó 60 a 90% de ácido araquidónico, más preferiblemente de 60 a 80% e incluso más preferiblemente de 60 a 70% de ácido araquidónico.

Preferiblemente, el aceite microbiano tiene un contenido en triglicéridos de desde 90 a 100%, tal como al menos 90 ó 96%, preferiblemente al menos 98%, más preferiblemente al menos 99% y óptimamente por encima de 99,5%. Típicamente, el aceite microbiano tendrá un contenido en ácido eicosapentaenoico (EPA, por sus siglas en inglés)

por debajo de 5%, preferiblemente por debajo del 1% y más preferiblemente por debajo de 0,5%. El aceite puede presentar menos de 5%, menos de 2%, menos de 1% de cada uno de, ácido graso poliinsaturado C<sub>20</sub>, C<sub>20:3</sub>, C<sub>22:0</sub> y/o C<sub>24:0</sub>, (los PUFA). El contenido en ácido graso libre (FFA) puede ser ≤ 0,4; 0,2 ó 0,1%.

- 5 De los triglicéridos, preferiblemente al menos el 40%, tal como al menos 50% y más preferiblemente al menos 60% de los PUFA presentes está en la posición α del glicerol (presente en la cadena principal del triglicérido) también conocido en la posición 1 ó 3. Se prefiere que al menos el 20%, tal como al menos 30%, más preferiblemente al menos 40% de los PUFA esté en la posición β(2).

El contenido en fosfolípido del aceite es convenientemente un máximo de 5%, 3% ó 2% y/o puede ser un mínimo de desde 0,1; 0,5 ó 1,0%.

- 10 Preferiblemente, el aceite habrá sido asilado de un hongo, más preferiblemente el aceite se aísla de *Mortierella* y en particular de *M. alpina*. El aceite se extrae convenientemente de hexano.

Contenido en ARA.

- 15 Puramente por claridad, se explicará el cálculo del contenido en ARA en porcentaje, especialmente como se puede calcular según la bibliografía, en ocasiones, el contenido en ARA sobre una base diferente. El porcentaje de ARA se basa en el aceite (que ha sido extraído de la biomasa) y no la propia biomasa. Es sobre una base peso por peso. Se basa en un aceite extraído por hexano y se basa, por lo tanto, en lípidos extraíbles en hexano (HEL, por sus siglas en inglés). Se basa en la cantidad total de aceite y no en la cantidad total de ácidos grasos (que a veces puede proporcionar una cifra mayor errónea). El contenido en ARA se determina mediante el protocolo analítico FAME conocido (usando los ésteres metílicos de ácidos grasos), detallado en AOCS Cel b89. En diferentes disolventes se extraerán diferentes lípidos. Obsérvese que, en el caso presente, el aceite se extrae primero con hexano y después se determina el contenido en ARA del aceite mediante análisis FAME. Esto proporcionará un resultado diferente de esterificar primero el ácido araquidónico (por ejemplo, mientras está aún en las células) y extrayendo después los ésteres metílicos resultantes para análisis adicional.
- 20

Índice de peróxido (IPO)

- 25 Preferiblemente, el IPO del aceite microbiano no es mayor que 3,0; 2,5 ó 2,0. Sin embargo, se pueden obtener valores de IPO mucho menores usando el procedimiento de la invención y estos valores pueden ser menores que 1,5 o menores que 1,0. Se pueden obtener valores menores que 0,8 e incluso menores que 0,4.

Índice de anisidina (IAn)

- 30 Preferiblemente, el índice de anisidina del aceite microbiano no es mayor que 1,0, por ejemplo, no mayor que 0,6; 0,3 o incluso no mayor que 0,1.

Usos y productos.

- 35 Se describe además una composición que comprende el aceite y en el caso de que sea apropiado una o más sustancias (adicionales). La composición puede ser un pienso y/o un suplemento alimenticio para animales o seres humanos. En realizaciones de la invención que son para consumo humano los aceites se pueden hacer adecuados para consumo humano, típicamente mediante refinado o purificación del aceite obtenido de los microbios.

La composición puede ser una fórmula infantil, productos alimenticios (seres humanos). En este caso la composición de la fórmula se puede ajustar así de manera que tenga una cantidad similar de lípidos o PUFA para leche materna normal. Esto puede implicar el mezclado del aceite microbiano de la invención con otros aceites para conseguir la composición apropiada.

- 40 La composición puede ser una composición o suplemento alimenticio animal o marino. Dichos alimentos y suplementos se pueden proporcionar a cualquier animal de criadero, en particular oveja, ganado vacuno y aves de corral. Además, los alimentos o suplementos pueden ser proporcionados a organismos marinos de criadero tales como pescado y crustáceos. La composición puede incluir así una o más sustancias o ingredientes alimenticios para dicho animal.

- 45 El aceite puede ser vendido directamente como aceite y estar contenido en un envase apropiado, típicamente botes de aluminio de una pieza recubiertos internamente con la laca epoxifenólica y purgados con nitrógeno. El aceite puede contener uno o más antioxidantes (por ejemplo, tocoferol, vitamina E, palmitato) cada uno por ejemplo a una concentración de desde 50 a 800 ppm, tal como 100 a 700 ppm.

- 50 Las composiciones adecuadas pueden incluir composiciones farmacéuticas o veterinarias, por ejemplo, para tomarse por vía oral o composiciones cosméticas. El aceite puede ser tomado como tal, o puede estar encapsulado, por ejemplo, en una carcasa, y puede estar así en la forma de cápsulas. La carcasa o las cápsulas pueden comprender gelatina y/o glicerol. La composición puede contener otros ingredientes, por ejemplo, saborizantes (por ej., sabor a limón o lima) o un portador o excipiente farmacéuticamente o veterinariamente aceptable.

Los elementos y características preferidos de un aspecto de la invención son igualmente aplicables a otro aspecto *mutatis mutandis*.

Ejemplos comparativos 1 y 2 y Ejemplos 3 y 4.

Producción de ácido araquidónico (ARA).

- 5 Se almacenó un vial de 1 ml de suspensión de cepa *Mortierella alpina* CBS 168.95 (depositada por DSM N. V., 2600 MA Delft, Países Bajos (que ha autorizado la presente solicitud para referirse a este material biológico depositado) en Centraal Bureau voor Schimmelcultures (CBS), Apartado de Correos 85.167, 3508 AD Utrecht, Países Bajos, el 20 de febrero de 1.995 bajo el depósito n° DS 30340), a -80°C y se abrió de manera aséptica. Se usaron los contenidos para inocular un matraz de 500 ml con 100 ml de un medio que contenía (g/l):
- 10 glucosa, 20;
- extracto de levadura (pasta Gistex® (80% de sólidos, 46% de proteína (Nx6,25), 16% de NaCl, pH (disolución al 2%) 5,6, 22% de ceniza, recuento de placa total 10<sup>4</sup>/g, *Enterobacteriaceae* < 10/g, *E. coli* < 1/g, levadura y mohos < 100/g, disponible en DSM N. V., Savory Ingredients Apartado de correos 1, 2600 MA Delft), 12,5;
- 15 antiespumante (compuesto antiespumante de silicio/no silicona Basildon 86/013K usado de acuerdo con las instrucciones del fabricante, Basildon Chemical Company, Kimber Road, Abingdon, Oxford, Inglaterra OX14IRZ), 0,2.
- El pH del medio se ajustó a 7,0 antes de autoclave.
- El cultivo se cultivó a 25°C durante 48 h con agitación a 26 rad/s (250 rpm) y se usó para la inoculación de cuatro matraces de 2.000 ml con 500 ml de un medio que contenía (g/l):
- 20 glucosa, 20; extracto de levadura (pasta Gistex®), 25; antiespumante (Basildon 86/013K), 0,2. El pH antes de esterilización fue 7,0.
- Estos cultivos se cultivaron a 25°C durante 24 h y usaron para siembra un fermentador de inoculación de 5 m<sup>3</sup> que contenía medio de 2.400 litros de la misma composición que se usó en los matraces de 2.000 ml (el pH antes de esterilización fue 6,0).
- 25 Se fijó la temperatura de la fermentación a 25°C, agitación a 16 rad/s (150 rpm), presión del recipiente a 50 kPa (0,5 bar) y tasa de aireación a 0,5 VVM.
- El cultivo del fermentador del inóculo se transfirió al fermentador principal después de aproximadamente 36 horas (la tasa de absorción del oxígeno fue >3 mmoles/kg/h).
- El principal fermentador contenía (g/l):
- 30 glucosa, 35;
- extracto de levadura (polvo Expresa 2200®, levadura de cerveza baja en sodio, peptona (extracto), sólidos > 96%, N total > 10%, N amino 6-7%, NaCl < 1%, pH (disolución al 2% 5,3-6,3), ceniza < 12,5%, polvo homogéneo disponible en DSM N. V., Savory Ingredients), 5,0;
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1,0;
- 35 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,0;
- MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,5;
- Basildon 86/013K, 0,3;
- ácido cítrico. 1H<sub>2</sub>O, 0,6;
- ZnCl<sub>2</sub>, 0,010;
- 40 Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> 20% H<sub>2</sub>O, 0,025;
- MnSO<sub>4</sub>·1H<sub>2</sub>O, 0,010; (pH antes de esterilización 5,0).
- La glucosa se esterilizó por separado y se añadió al fermentador principal después de esterilización.
- La fermentación duró durante 175 horas. El pH del medio continuó siendo aproximadamente pH 6 (+/- 0,1) con una aireación (flujo de aire) de 0,5 VVM, la presión del aire a 80 kPa (0,8 bar) y agitación a 7 rad/s (70 rpm). Se mantuvo el nivel de oxígeno a D. O. ≥ 30% aumentando secuencialmente la velocidad de agitación a 10,5 rad/s (100 rpm) y
- 45

flujo de aire a 0,9 VVM.

Se alimentó una disolución de glucosa estéril de aproximadamente 50% (p/p) al fermentador para mantener la concentración de glucosa a aproximadamente 10 g/l y de aproximadamente 30 a 78 h, se alimentaron 625 kg de una disolución de extracto de levadura al 25% al fermentador con una tasa de alimentación controlada de tal manera que la concentración de amoníaco fue < 30 mg/l.

5

El experimento se llevó a cabo cuatro veces (Ejemplos 1 a 4) y la concentración de glucosa del medio de cultivo se controló a lo largo del tiempo. En el ejemplo 4, la concentración de glucosa fue 2,2 g/kg a 172 horas. Esto fue tres horas antes del final de la fermentación (EoF). El nivel de glucosa fue cero a aproximadamente una hora antes del EoF.

10

En los Ejemplos comparativos 1 y 2, la concentración de la fuente de carbono (glucosa) estuvo muy por encima de 5 g/kg al final de la fermentación. Por supuesto, 10 horas antes del EoF, la concentración de glucosa fue aproximadamente 20 g/kg. Así, en los Ejemplos 1 y 2, la concentración de glucosa fue de modo que no fuera limitante en el grupo de los microorganismos o en la producción de ARA.

15

En los Ejemplos 3 y 4, la concentración de glucosa en la última fase de la fermentación, inmediatamente precediendo al EoF, se controló de tal manera que aproximadamente 10 horas antes del EoF la concentración de glucosa fue aproximadamente 5 g/kg. Durante esta última fase, más de 10 horas, la glucosa se añadió a una tasa de adición de 0,5 g/kg/h. La concentración de glucosa fue virtualmente cero en el EoF. Durante este periodo, la tasa de consumo de la glucosa fue aproximadamente dos veces la tasa de adición, es decir aproximadamente 1 g/kg/h.

20

La concentración de glucosa (g/kg) en el medio de cultivo con el tiempo, durante la fermentación se muestra en las Tablas 1 a 4 (que corresponde a los Ejemplos 1 a 4).

Tabla 1

Tiempo (h)	Concentración de glucosa g/kg
0	48,7
24	57,6
28	47,8
54	46,4
78	62,0
102	62,5
126	48,2
150	42,5
167	20

Tabla 2

Tiempo (h)	Concentración de glucosa g/kg
0	47,8
28	32,5
54	32,2
78	41,3
102	49,5

Tiempo (h)	Concentración de glucosa g/kg
126	46,8
150	29,9
165	17,1

Tabla 3

Tiempo (h)	Concentración de glucosa g/kg
0	49,2
28	60,1
54	40,8
78	34,0
102	37,3
126	23,2
150	16,7
172	7

Tabla 4

Tiempo (h)	Concentración de glucosa g/kg
0	45
28	34,1
54	34,7
78	29,2
102	38,1
126	45
150	23,5
172	2,2

5

Al final de la fermentación, los microorganismos y el líquido acuoso circundante (el caldo de fermentación) se retiraron del fermentador. El caldo sufrió separación sólido-líquido para retirar algo del agua. Después se extruyeron las células restantes y se sometieron a extracción en disolvente usando hexano. Así se obtuvo un aceite microbiano que contenía ARA (lípidos extraíbles en hexano) de células que experimentaban cada uno de los cuatro protocolos de fermentación diferentes.

10

El contenido en ARA en porcentaje del aceite (sobre una base peso por peso) se determinó entonces usando el protocolo analítico FAME conocido (como se detalla en AOCS Ce1b89). En el Ejemplo 3, la concentración de ARA en el aceite microbiano fue 508 g/kg (50,8%). La cifra equivalente para el Ejemplo 4 fue 545 g/kg (ARA al 54,5%). Por comparación, el aceite microbiano extraído de las células en los Ejemplos comparativos 1 y 2 fue mucho menor

a 36,8% y 36,7%, respectivamente.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un procedimiento para la producción de un aceite microbiano que comprende al menos 40% de ácido araquidónico (ARA) basado en el aceite y con un contenido en triglicéridos de al menos 90%, comprendiendo el procedimiento cultivar un microorganismo en un medio de cultivo en el interior de un recipiente de fermentación, según lo cual se añade fuente de carbono durante la fermentación y según lo cual en una fase que precede inmediatamente al final de la fermentación y que comienza a de 15 a 2 horas antes del final de la fermentación, la fuente de carbono es limitante de la tasa en el crecimiento de los microorganismos o se restringe de manera que los microorganismos metabolizan la grasa o las grasas y/o el lípido o los lípidos y en el que el procedimiento comprende además extraer el aceite de los microorganismos usando un disolvente no polar.
- 10 2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que la fuente de carbono es glucosa.
3. Un procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que la fermentación (completa) se lleva a cabo a una temperatura  $\geq 22^{\circ}\text{C}$  y  $\leq 30^{\circ}\text{C}$ .
4. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que:
- h) se realiza en ausencia de un aceite aditivo;
- 15 i) la fermentación no dura más de 9 días y/o
- j) el volumen del fermentador es al menos  $20\text{ m}^3$ .
5. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el microorganismo es *Mortierella*.
- 20 6. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el microorganismo es *Mortierella alpina*.
7. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que durante una etapa más temprana de fermentación la fuente de carbono está en exceso.
8. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el disolvente es hexano.
- 25 9. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las células se pasteurizan después de que termina la fermentación.
10. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el aceite comprende al menos ARA al 50% basado en el aceite.