

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 520**

51 Int. Cl.:

C12P 7/64 (2006.01)

A23D 9/00 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.09.2013 PCT/FR2013/052092**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.03.2014 WO14041303**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2013 E 13776529 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2018 EP 2895628**

54 Título: **Aceite enriquecido en ácido araquidónico procedente de microorganismos (hongo unicelular Mortierella alpina) y su procedimiento de preparación**

30 Prioridad:

14.09.2012 CN 201210343057

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

11.03.2019

73 Titular/es:

**ROQUETTE FRÈRES (100.0%)
1 rue de la Haute Loge
62136 Lestrem, FR**

72 Inventor/es:

**QIAN, YUN;
ZHOU, JIE y
PORA, BERNARD**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 703 520 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

Aceite enriquecido en ácido araquidónico procedente de microorganismos (hongo unicelular *Mortierella alpina*) y su procedimiento de preparación

5 La presente invención se refiere a una nueva composición de aceite rico en ácido araquidónico, aceite producido por un microorganismo, preferiblemente producido por un hongo unicelular (moho filamentoso) del género *Mortierella*, en este caso una cepa de *Mortierella alpina* particular.

Los lípidos constituyen una de las tres grandes familias de macronutrientes con las proteínas y los glúcidos.

Entre los lípidos, se distinguen en particular los triglicéridos y los fosfolípidos.

10 Los triglicéridos representan aproximadamente el 95% de los lípidos alimentarios ingeridos. En el organismo, están presentes principalmente en los tejidos adiposos y constituyen la forma principal de almacenamiento de la energía.

Los fosfolípidos son unos lípidos de estructura ya que son unos constituyentes de las membranas celulares de las cuales aseguran, entre otras cosas, la fluidez.

Los triglicéridos y fosfolípidos están compuestos principalmente de ácidos grasos, que son al mismo tiempo aportados por la alimentación y, para algunos de ellos, sintetizados por el organismo.

15 La clasificación bioquímica (basada en el número de dobles enlaces contenidos en la molécula de ácido graso) distingue los ácidos grasos saturados (AGS), los ácidos grasos monoinsaturados (AGMI), y los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI).

Desde el punto de vista fisiológico, se distinguen:

20 - los ácidos grasos indispensables, necesarios para el desarrollo y el buen funcionamiento del cuerpo humano, pero que nuestro cuerpo no sabe fabricar;

- los ácidos grasos denominados "condicionalmente" indispensables, esenciales para el crecimiento normal y las funciones fisiológicas de las células, pero que pueden fabricarse a partir de su precursor si se aporta por la alimentación. Son por lo tanto rigurosamente necesarios si el precursor indispensable está ausente.

- Los ácidos grasos no indispensables.

25 El conjunto de los ácidos grasos indispensables y "condicionalmente" indispensables constituyen los ácidos grasos esenciales.

Los otros ácidos grasos se denominan no esenciales.

30 Se distinguen dos grandes familias de ácidos grasos esenciales: los ácidos grasos omega 6 (o AGPI n-6), cuyo precursor y representante principal es el ácido linoleico (LA) y los ácidos grasos omega 3 (o AGPI n-3) cuyo precursor es el ácido alfa-linolénico (ALA).

Entre los ácidos grasos no indispensables, se encuentran en particular:

- el ácido eicosapentaenoico (EPA) de la familia de los ácidos grasos omega 3,

- el ácido oleico, ácido graso monoinsaturado mayoritario en nuestra alimentación, y

- los ácidos grasos saturados.

35 Además de su producción a partir de cacahuetes, de cártamo, de colza, de maíz, de lino, de nuez, de sésamo, de soja, de girasol, se puede producir una gran variedad de ácidos grasos poliinsaturados por diferentes organismos unicelulares (algas, hongos, etc.).

El ácido araquidónico ("ARA") es un ácido graso de cadena larga que se encuentra en algunos aceites vegetales.

40 Es un ácido graso poliinsaturado de C20:4 (n-6, n-9, n-12, n-15), es decir un ácido graso de 20 átomos de carbono y cuatro enlaces etilénicos situados sobre los átomos de carbono n°5 (n-15), n°8 (n-12), n°11 (n-9) y n°14 (n-6).

Es un ácido graso también denominado "tetraenoico" ya que posee 4 insaturaciones (4 dobles enlaces carbono-carbono).

Se encuentra también en la bibliografía bajo la denominación "todos cis 5,8,11,14-eicosatetraenoico" (cis" que define la configuración de los dobles enlaces, estando "todos" los dobles enlaces en configuración "cis").

45 El ARA es uno de los AGPI de C20 más abundante en el cuerpo humano, en el que se fabrica a partir del ácido

linoleico.

Se encuentra en los órganos, los músculos y la sangre.

El ARA es un precursor importante de una gran variedad de compuestos biológicamente activos, conocidos colectivamente bajo el término "eicosanoides", un grupo que comprende las prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos.

Estos eicosanoides presentan unos efectos reguladores sobre el metabolismo de las lipoproteínas, de la reología de la sangre, del tono muscular, de la función de los leucocitos, de la activación plaquetaria y del crecimiento celular.

El ARA es también uno de los componentes de la fracción lipídica de la leche materna humana y se considera como esencial para el desarrollo neurológico óptimo en los lactantes.

En su esfuerzo por obtener unas preparaciones para lactantes que correspondan al perfil de los ácidos grasos de cadena larga de la leche materna, los científicos y organismos de reglamentación de los alimentos han recomendado que el ácido araquidónico se añada a las preparaciones para lactantes, en particular en la fórmula utilizada para los bebés prematuros.

En particular, es preferible que el aceite que contiene el ácido araquidónico producido para su utilización en preparación para lactantes contengan poco o nada de otros AGPI (por ejemplo, el ácido eicosapentaenoico o EPA).

En efecto, estos otros AGPI no se recomiendan por que algunos de estos ácidos grasos pueden interferir con la utilización del ácido araquidónico como tal para el niño, y/o puede obstaculizar la mezcla del aceite que contiene el ácido araquidónico con otros aceites para alcanzar la relación apropiada de los ácidos grasos de la leche materna (leche materna reconstituida) o para otras aplicaciones deseadas.

Por otro lado, el ARA tiene una gran variedad de aplicaciones tales como la utilización en preparaciones para los productos alimenticios en el ser humano, pero también como alimentos para animales.

El ARA tiene, en efecto, varias propiedades reconocidas en nutrición animal:

- propiedades antiinflamatorias, ya que el ARA es un precursor de las prostaglandinas serie II y de la anandamida (principalmente demostradas en el cerdo),

- propiedades anti-estrés en el pez (dorada) por otra vía distinta de las prostaglandinas,

- propiedades inmuno-moduladoras en los cerdos.

Se han realizado también unos estudios de transferencia para visualizar el paso del ácido araquidónico en la carne, la leche o los huevos producidos.

Cuando se aísla a partir de microorganismos, el producto comercial está disponible en particular en forma de un aceite rico en ácido araquidónico obtenido gracias a la fermentación de los mohos filamentosos del género *Mortierella*.

En el documento EP 276541, se describe así un procedimiento de producción de ARA por *Mortierella elongata*, *Mortierella exigua* y *Mortierella hygrophila*.

La solicitud de patente internacional WO 94/28913 describe, por su parte, un procedimiento de fermentación que utiliza *Mortierella alpina* para producir ARA sustancialmente desprovisto de EPA. Sakuradani *et al.* (2004, Applied Microbiology and Biotechnology, 66, 243-248), Shinmen *et al.* (1989, Applied Microbiology and Biotechnology, 31, 11-16) y Certik *et al.* (1998, Trends in Biotechnology, 16, 500-505) describen unos procedimientos que utilizan *Mortierella alpina* y que producen como mínimo un 50% de ARA. El documento EP 1 035 211 describe una cepa de *Mortierella alpina* obtenida por mutagénesis y que presenta buenas capacidades de producción de ARA.

Sin embargo, como se afirma en el documento EP 726.321, de todas las *Mortierella* ensayadas para su producción en ARA (*alpina*, *hygrophila*, *spinosa*, *schmuckeri* y *carmagensis*), son las cepas de *Mortierella schmuckeri* o *Mortierella carmagensis* las que presentan la productividad más ventajosa.

Por lo tanto, se admite por los especialistas en el campo de la producción de ARA que es por la elección de una cepa de *M. Schmuckeri* o *M. carmagensis* por lo que se pueden garantizar los mejores rendimientos, productividad o calidad, en detrimento de *M. alpina*, *hygrophila* o *spinosa*.

Sin embargo, sigue siendo una necesidad disponer de medios alternativos que permitan producir aceites de calidad, con alto contenido en ARA, y que presenten perfiles muy particulares en ácidos grasos saturados o polinsaturados de cadena larga.

Por otro lado, para numerosas Autoridades Regulatoras nacionales, sólo la *Mortierella alpina* está autorizada en alimentación infantil.

Fue, en primer lugar, mérito de la compañía solicitante proponer una nueva composición de aceite, enriquecida en ácido araquidónico, que presenta:

- bajos contenidos en ácido graso poliinsaturado diferente del ARA (tal como EPA),
- un contenido limitado en algunos ácidos grasos saturados de larga cadena (tales como el ácido behénico, el ácido mirístico, el ácido palmítico, o el ácido lignocérico).

Por otro lado, se ha destacado por la compañía solicitante que el bajo contenido en estos ácidos grasos saturados permite obtener un aceite de mejor calidad que los del mercado en términos de limpidez y de baja turbiedad en frío.

Preocupada también por elaborar un procedimiento de producción mucho más eficaz y mucho menos costoso que los descritos en el estado de la técnica, la compañía solicitante ha identificado, durante sus investigaciones, una nueva cepa de *Mortierella alpina* que presenta una capacidad excepcional de producción de ácido araquidónico, ya que permite una producción que alcanza más del 50% de ácido araquidónico (entendiéndose aquí los % en peso de ácidos grasos totales).

La compañía solicitante ha ido por lo tanto en contra de un prejuicio técnico, que tiene como objetivo buscar en las cepas de tipo *M. Schmuckeri* o *M. carmagensis* las mejores cepas productoras de ARA.

Por otro lado, además de la capacidad destacable de producción de ácido araquidónico, esta cepa permite también obtener (entendiéndose aquí los % en peso de ácidos grasos totales):

- menos del 0,5%, preferentemente menos del 0,2% de EPA,
- menos del 0,5%, preferentemente menos del 0,2% de ácido mirístico (C14:0),
- menos del 9%, preferentemente menos del 7% de ácido palmítico (C16:0),
- menos del 3%, preferentemente menos del 2,5% de ácido behénico (22:0), y
- menos del 3%, preferentemente menos del 2,5% de ácido lignocérico (C 24:0).

Esta cepa de *Mortierella alpina* se ha depositado en Francia el 12 de junio de 2012 en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos del Instituto Pasteur (CNCM) bajo el número CNCM I-4642, pero también en China en CHINA CENTER FOR TYPE CULTURE COLLECTION (CCTCC) de la universidad de Wuhan, Wuhan 430072, P.R. China bajo el número M 209116.

Se ha caracterizado por secuenciación de la región D1 - D2 del gen que codifica ARN 25S (SEQ ID N° 1):

```

1  TTAACAGTG CGTGAAATTG TTGAAAGGGA AACGCTTGAC ACCAGTCATG CGAGCGGAAA
61  ATCAGTCTTT TGCAGTGGGG AGTTGTGTGG GTTCGGACCG CAAGGCCGGC CTGTGCTGCA
121 TCTCTGCTGT AAGTGATGCA CTTTTCGTT TGCAGGCCAA CATCAGTTTC TTCTGCTGGA
181 CAAAACCTTT GAGAAGGTAG CAGCTTTGGC TGTGTTATAG CTCTTGAGCG ATACAGTGGA
241 GGGGACTGAG GTTTTGCGAG CGCGTGCTCT CGGGCAAGGC TGATTGGGTG CTATGGGATC
301 GTTCGGTGTA CAATGCATGC ATTTTGCGCC GTGTCTTTTC TGTACTCGCT CAACTCGGCT
361 C
    
```

Esto ha permitido identificarla como una cepa de tipo *Mortierella alpina*.

En consecuencia, la presente invención se refiere a la cepa de *Mortierella alpina* depositada el 12 de junio de 2012 en la CNCM bajo el número I-4642.

Esta cepa podrá designarse "CNCM I-4642" posteriormente en la presente solicitud.

La presente descripción describe también una variante de esta cepa o una cepa derivada de esta, conservando dicha variante o dicha cepa derivada la propiedad de producir unos contenidos en ácido araquidónico elevados. En particular, permite una producción de ARA de cómo mínimo un 50% de ácido araquidónico en peso de ácidos grasos totales.

En particular, se refiere a una cepa de *Mortierella alpina* obtenida a partir de la cepa CNCM I-4642 por mutagénesis o por transformación génica. La mutagénesis puede ser dirigida y/o aleatoria.

La presente descripción describe también un método de preparación de tal cepa que comprende la mutagénesis o la transformación génica de la cepa CNCM I-4642 y facultativamente una etapa de cribado que permite seleccionar las cepas que producen al menos un 50% de ácido araquidónico en peso de ácidos grasos totales.

La presente descripción describe un método de cultivo de la cepa CNCM I-4642 o de una variante o cepa derivada de esta que conserva la capacidad de producción de ácido araquidónico, que comprende una etapa de cultivo de esta

cepa en un medio apropiado y en condiciones de fermentación adecuadas.

La presente descripción describe por otro lado un método de preparación del ácido araquidónico en forma de un aceite extraído de la cepa CNCM I-4642 o de una variante o cepa derivada de esta, caracterizada por que el aceite que contiene el ácido araquidónico se prepara mediante un método que comprende:

5 * cultivar la cepa en condiciones heterotróficas a fin de producir una biomasa que presenta entre el 40 y el 55% en peso de lípidos, preferiblemente entre el 40 y el 50% en peso de lípidos, más preferiblemente aún del orden del 45% en peso de lípidos y entre el 50 y el 55% en peso de ARA con respecto al peso de ácidos grasos totales.

* recoger la biomasa así preparada,

* secar dicha biomasa,

10 * extraer el aceite por disolvente seleccionado del grupo constituido del hexano y del butano, más particularmente por butano líquido, y

* refinado y recuperación del aceite así extraído.

15 De manera opcional, la biomasa que resulta de la etapa de extracción del aceite puede, por su parte, recuperarse y valorizarse en nutrición animal (como complemento alimenticio para animales de granja (cerdos, etc.), animales de compañía y en acuicultura).

El cultivo se realiza en condiciones heterotróficas. Generalmente, la etapa de cultivo comprende una etapa de precultivo, para revivificar la cepa, después una etapa de cultivo o de fermentación propiamente dicha. Esta última etapa corresponde a la etapa de producción de los compuestos lipídicos de interés.

20 La compañía solicitante recomienda, para la cepa CNCM I-4642, realizar una fermentación aeróbica en cinco etapas, como se ejemplificará a continuación.

Las cuatro primeras etapas se caracterizan por un cultivo de la cepa CNCM I-4642 en un medio en el que la aportación en cepa de carbono está regulada en función de la cinética de producción de la biomasa, de los lípidos totales y del ácido araquidónico.

25 En estas cuatro etapas, cabe señalar que, al contrario de otros procedimientos del estado de la técnica para la producción de ácido araquidónico por fermentación de *Mortierella*, la alimentación con fuente de carbono no es, o lo es poco, limitante en lo que se refiere al crecimiento del microorganismo.

Por el contrario, durante la quinta etapa, el medio de cultivo presenta una baja concentración en fuente de carbono, como máximo un 1% en peso y la alimentación con fuente de carbono incluso se detiene.

30 En esta etapa, la fuente de carbono se vuelve limitante para el crecimiento del microorganismo, o está limitada de tal manera que los microorganismos son conducidos a metabolizar sus propias materias grasas y/o lípidos.

Es importante señalar que, contrariamente a lo que está descrito en la bibliografía:

- no es útil aquí regular/controlar la concentración en oxígeno disuelto en el medio de cultivo, sino más bien mantenerla al máximo. Por lo tanto, no hay aquí regulación en la aportación en oxígeno para aumentar la producción de ARA.

35 - no es tampoco útil definir precisamente las aportaciones en fosfatos, en potasio, en sodio, en magnesio y en calcio en el medio de cultivo, para controlar en particular la morfología del micelio del microorganismo durante la fermentación.

La presente descripción describe después la recuperación, al final de fermentación, de la biomasa rica en compuestos lipídicos de interés, en este caso aquí ARA.

Después de la etapa de fermentación, la biomasa puede:

40 - pasteurizarse, a fin de inactivar las enzimas de degradación de los lípidos (lipasas) presentes en la biomasa como tal, pero también en el medio de cultivo,

- recuperarse del medio de fermentación mediante cualquier método en sí conocido por el experto en la materia, por ejemplo la biomasa puede extraerse del fermentador y simplemente concentrarse por microfiltración o centrifugación, o lavarse por sucesión de concentraciones-diluciones con una solución acosa.

45 La presente descripción se refiere a la biomasa que comprende la cepa CNCM I-4642 o de una variante o de una cepa derivada de esta que conserva la capacidad de producción de ARA.

Muy particularmente, después de la etapa de fermentación o cultivo, esta biomasa es rica en compuestos lipídicos de interés tales como ARA.

ES 2 703 520 T3

Es susceptible de obtenerse mediante el método descrito en el presente documento.

Después de la fermentación, la biomasa puede contener:

- entre el 40 y el 55% en peso de lípidos con respecto al peso total de la biomasa, preferiblemente entre el 40 y el 50% en peso de lípidos, más preferiblemente aún del orden del 45% en peso de lípidos, y

5 - entre el 50 y el 55% en peso de ARA con respecto al peso de ácidos grasos totales.

Además de la biomasa, la presente descripción también se refiere a un extracto o lisado celular, preparado a partir de esta biomasa, que comprende la cepa CNCM I-4642 o una variante o una cepa derivada de esta que conserva la capacidad de producción de ARA.

En particular, este extracto o lisado se prepara a partir de la biomasa recuperada después de la fermentación.

10 Este extracto o este lisado es entonces rico en compuestos lipídicos de interés tales como ARA. En particular, podrá contener entre el 40 y el 55% en peso de lípidos, preferiblemente entre el 40 y el 50% en peso de lípidos, más preferiblemente aún del orden del 45% en peso de lípidos y entre el 50 y el 55% en peso de ARA con respecto al peso de ácidos grasos totales, y entre el 50 y el 55% en peso de ARA con respecto al peso de ácidos grasos totales.

15 La ruptura de las células para la extracción del contenido lipídico podrá efectuarse mediante diferentes vías, incluyendo las vías mecánica, química y enzimática.

La presente descripción se refiere también a un aceite extraído de la biomasa por un disolvente seleccionado del grupo constituido por el hexano y el butano, más particularmente por el butano líquido, en particular en varias extracciones sucesivas.

El aceite se puede recuperar después de la destilación al vacío.

20 Sin embargo, preferentemente, el aceite se recupera después de dos fases de refinado y de purificación.

La fase de refinado comprende seis etapas sucesivas clásicamente realizadas por el experto en la materia:

- desengomado: acidificación con ácido cítrico,
- saponificación: neutralización con álcalis,
- centrifugación para eliminar las gomas y los jabones,

25 - lavado con agua,

- decoloración con tierra de sílice, carbón activo y arcilla, y
- filtración.

La fase de purificación tiene por objetivo eliminar los malos sabores, los peróxidos y optimiza la estabilidad del aceite.

Esta fase comprende, sucesivamente, una o dos etapas de:

30 - destilación molecular (utilizada si el contenido en insaponificables (factor UNS) está demasiado elevado),
- desodorización con vapor a alto vacío.

Como se ejemplificará a continuación, la compañía solicitante recomienda recuperar también la fracción volátil procedente de la etapa de desodorización con vapor a alto vacío.

35 En efecto, esta fracción está constituida de al menos el 80% de triglicéridos (cuya distribución en ácidos grasos es comparable con la del aceite de ARA refinado) y contiene del orden del 10% en escualeno.

Así, el método de producción de ARA comprende:

- la recogida de la biomasa,
- el secado de la biomasa o la preparación del lisado celular,
- la extracción del aceite, y

40 - el refinado y la purificación del aceite.

El aceite se extrae de la biomasa microbiana seca que proviene de un caldo de fermentación pasteurizado.

La biomasa se recoge y se seca, después se extrae el aceite de la biomasa seca utilizando por ejemplo el butano líquido como disolvente.

La biomasa residual se recupera, se seca y se acondiciona para aplicaciones en nutrición animal.

5 Finalmente, el aceite presenta al menos un 50% de ARA y al menos un 90% de triglicéridos con respecto al peso de ácidos grasos totales.

La presente descripción se refiere finalmente a la utilización del ARA o del aceite rico en ARA, producido por uno cualquiera de los procedimientos de la presente descripción, en la preparación de composiciones destinadas a los campos alimentarios, en particular la alimentación infantil.

10 Así, se refiere a un método de preparación de composiciones destinadas a los campos alimentarios que comprenden la producción de ARA o de aceite rico en ARA mediante uno cualquiera de los procedimientos de la presente descripción, después la preparación de composiciones destinadas a los campos alimentarios añadiendo dicho ARA o aceite rico en ARA.

15 La presente descripción se refiere en particular a un producto o a una composición que comprende la cepa CNCM I 46-42 o una variante o de una cepa derivada de esta que conserva la capacidad de producción de ARA, una biomasa obtenida después del cultivo o de la fermentación de esta, un extracto o lisado celular de esta. Se refiere también a un producto o a una composición que comprende un aceite rico en ARA producido por uno cualquiera de los procedimientos de la presente descripción. Dicho producto o dicha composición son ricos en compuestos lipídicos de interés, tal como el ácido araquidónico (o ARA). En particular, dicho producto o dicha composición es rico en ARA. Preferentemente, comprenden más del 50% de ácido araquidónico (o ARA) en peso sobre ácido graso totales. 20 Además, presentan:

- menos del 0,5%, preferentemente menos del 0,2% de EPA,
- menos del 0,5%, preferentemente menos del 0,2% de ácido mirístico (C14:0),
- menos del 9%, preferentemente menos del 7% de ácido palmítico (C16:0),
- menos del 3%, preferentemente menos del 2,5% de ácido behénico (C22:0) y
- 25 - menos del 3%, preferentemente menos del 2,5% de ácido lignocérico (C 24:0).

Preferentemente, este producto o esta composición es una composición alimentaria o un complemento alimentario o nutricional.

Puede estar en forma líquida o sólida.

En particular, el producto puede contener un liofilizado de células o extracto o lisado celular de esta.

30 Este producto o esta composición pueden estar en forma de polvo, gránulo, cápsula de gel, cápsula, o pastilla, preferentemente en forma de polvo.

Alternativamente, el producto o la composición está en forma líquida y comprende el aceite bruto o refinado obtenido mediante uno cualquiera de los procedimientos de la presente descripción.

35 En cuanto a la biomasa residual que resulta de la etapa de extracción del aceite, ésta presenta una composición perfectamente adecuada para su utilidad en nutrición animal, tal como se ejemplificará a continuación.

La invención se entenderá mejor con la ayuda de los ejemplos siguientes, los cuales pretenden ser ilustrativos y no limitativos.

Ejemplo 1: Producción de un aceite rico en ARA mediante la cepa de *Mortierella alpina* CNCM I-4642

40 La fermentación principal se efectúa en unos fermentadores que contienen unos medios de cultivo inoculados con dos series de fermentadores de tamaño más pequeño:

Precultivo rápido (6 x 200 ml)

- en un medio que contiene un 3% de glucosa, un 1,5% de polvo de levadura (contenido en nitrógeno del 7%),
- temperatura de 28°C,
- agitación de 240 rpm,
- 45 - Duración de 24 - 48 horas,

ES 2 703 520 T3

Al final de este precultivo: los 6 x 200 ml se mezclan juntos en un reactor de 3 l.

Primera etapa de fermentación (reactor de 1 m³)

- en un medio que contiene un 3% de glucosa, un 1,5% de polvo de levadura (contenido en nitrógeno del 7%),
- porcentaje de inóculo: del 0,1 al 1% vol.,
- 5 - Tp: 28°C,
- Presión: 0,03 mPa,
- Porcentaje de ventilación: máximo,
- Sin agitación mecánica,
- Duración: de 32 a 48 h,
- 10 - Volumen útil: un 70% del volumen total,
- pH: 6 a 6,5 (ajustado con álcalis),
- Volumen final: 750 l.

Segunda etapa de fermentación (reactor de 10 m³)

- 15 - en un medio que contiene un 4% de glucosa, un 1,5% de polvo de levadura (contenido en nitrógeno del 7%), un 0,2% de antiespumante (aceite de girasol),
- porcentaje de inóculo: del 10 al 15% vol.,
- Tp: 28°C,
- Presión: 0,03 mPa,
- Porcentaje de ventilación: máximo,
- 20 - Sin agitación mecánica,
- Duración: de 24 a 32 h,
- Volumen útil: un 70% del volumen total,
- pH: de 6 a 6,5 (ajustado con álcalis),
- Volumen final: 7,5 m³.

25 Fermentación principal (reactor de 85 m³)

- en un medio que contiene un 3% de glucosa, un 2% de polvo de levadura (contenido en nitrógeno del 7%), un 0,2% (aceite de girasol),
- Relación C/N (Carbono / Nitrógeno): de 7 a 8,
- Porcentaje de inóculo: del 15 al 25% vol.,
- 30 - Tp: 27 - 28 °C,
- Porcentaje de ventilación: máximo,
- Sin agitación mecánica,
- Duración: de 155 a 165 h,
- Volumen útil: un 70% del volumen total,
- 35 - pH: 7 - 7,1,
- volumen final: 60 - 63 m³.

Si se trata de describir esta etapa de fermentación principal, se recuerda que se trata aquí de un proceso de fermentación aeróbica.

ES 2 703 520 T3

El reactor de fermentación se define a fin de efectuar la ventilación y la mezcla de las células y del medio de cultivo sin medio mecánico: se prefiere aquí una columna de burbujas ("bubble column") de un diámetro de 3,5 m y de una altura de 8,7 m.

5 El volumen total del fermentador es de 85 m³. La fermentación dura generalmente de 6 a 7 días (155 a 165 horas) y la temperatura es de 27 a 28°C.

Un medio apropiado, pero simple, se utiliza en la fermentación.

La fuente de carbono preferida está únicamente constituida de glucosa y la fuente de nitrógeno está constituida de polvo de levadura (un 7% de contenido en N).

La relación molar C/N es ahora de 7 a 8.

10 Las fuentes de nitrógeno y de carbono se esterilizan por separado y se añaden separadamente.

La fuente de nitrógeno se proporciona de una sola vez al principio de la fermentación de la glucosa y se añade en modo "alimentación discontinua".

El medio de cultivo es agua que contiene:

15 - el agente antiespumante (a base de silicona de calidad alimenticia) y/o aceite de girasol para controlar el nivel de espuma producida, y

- el hidróxido de sodio (NaOH) para controlar el pH a un valor óptimo comprendido entre 6,5 y 7,1.

La temperatura óptima es preferentemente de 27 a 28°C.

El medio se agita durante la fermentación.

20 Esto se realiza mediante una ventilación producida por "burbujeo" de aire esterilizado en el medio y que proporciona oxígeno a las células.

La ventilación no está controlada y se mantiene máxima durante toda la duración de la fermentación a un valor comprendido entre 0,8 y 1 VVM.

No hay ventilación mecánica suplementaria para favorecer la ventilación.

25 Al final de la fermentación, cuando el contenido en glucosa es igual a cero y el aumento del pH a más de 7,5 (lo que indica un principio de lisis de las células), el reactor se detiene y los microorganismos pueden entonces retirarse de la cuba de fermentación gracias a una filtración (filtro-prensa).

Durante la fermentación en el reactor de 85 m³, se controla toda la cantidad de fuente de carbono presente en el medio y se identifican claramente cinco etapas, como se describe a continuación:

1. Primera etapa

30 Ésta empieza a partir de $t = 0$ h y termina generalmente después de 20 a 24 horas.

Durante este periodo, la fuente de carbono está en exceso y no debe ser limitante para el crecimiento de las células.

La fuente de carbono no se añade durante este periodo y el contenido en azúcares reductores del medio disminuye de 30 a 20 g/l.

El pH no se controla; su valor disminuye ligeramente de 6,3 a 5,7.

35 Al final de esta primera etapa, la concentración en biomasa puede alcanzar 16 g/l de medio, el contenido en lípidos totales es de al menos 4,7 g/l de medio, y el contenido en ácido araquidónico es preferentemente de más de 1,3 g/l de medio.

2. Segunda etapa

Ésta empieza a $t = 20$ horas y termina generalmente después de 50 a 55 horas.

40 Durante este periodo, la fuente de carbono disponible no debe ser limitante y la velocidad de adición debe ser normalmente ligeramente inferior a la tasa de consumo de las células.

Una solución de glucosa (25 g/l) se añade a una tasa media de 0,15 M de carbono/kg de medio por hora (la unidad es una cantidad molar de carbono en la fuente de carbono) y el contenido en azúcares reductores en el medio disminuye de 20 a 11 g/l.

El pH se ajusta y controla de 5,7 a 7 alimentando por una solución de NaOH.

Al final de esta segunda etapa, la concentración de la biomasa puede alcanzar 21 g/l de medio, el contenido total en lípidos es de al menos 8,3 g/l de medio y el contenido en ácido araquidónico es preferentemente de más de 3,1 g/l de medio.

- 5 Estas dos primeras etapas tienen como objetivo producir la cantidad principal de biomasa.

3. Tercera etapa

Ésta empieza a t = 55 horas y termina generalmente al final de 100 a 105 horas.

Durante este periodo, la fuente de carbono disponible no es todavía limitante y la tasa de adición debe ser generalmente inferior a las tasas de consumo por las células.

- 10 Una solución de glucosa (25 g/l) se añade a una tasa media de 0,08 M / kg de medio por hora) y el contenido en azúcares reductores disminuye de 11 a 4 g/l.

El pH se ajusta y se controla a un valor de 7 a 7,1 añadiendo una solución de NaOH

Al final de esta tercera etapa, la concentración de la biomasa puede alcanzar 24 g/l, el contenido total en lípidos es de al menos 11 g/l y el contenido en ácido araquidónico preferentemente de más de 5 g/l de medio.

- 15 4. cuarta etapa

Ésta empieza a t = 100 horas y termina generalmente después de 130 a 135 horas.

Durante este periodo, la fuente de carbono está ligeramente limitada, y la tasa de adición debe generalmente ser inferior a la tasa de consumo por las células.

- 20 Una solución de glucosa (25 g/l) se añade a una tasa media de 0,04 M de carbono/kg de medio por hora y el contenido en azúcares reductores disminuye de 4 a 1 g/l.

El pH no se controla y aumenta ligeramente, pasando de 7,1 a 7,3.

Al final de esta cuarta etapa, la concentración de la biomasa puede alcanzar 26 g/l de medio, el contenido total en lípidos es de al menos 12,4 g/l de medio y el contenido en ácido araquidónico es preferentemente de más de 6,2 g/l de medio.

- 25 La tercera y cuarta etapas tienen, como objetivo, producir la cantidad principal de lípidos.

5. quinta etapa

Ésta empieza a t = 130 horas y termina generalmente después de 160 a 170 horas.

Durante este periodo, la fuente de carbono disponible es limitante, y la alimentación con la fuente de carbono se detiene.

- 30 La cantidad en azúcares reductores en el medio disminuye rápidamente de 1 a 0 g/l.

El pH no se controla y aumenta ligeramente de 7,3 a 7,5.

Al final de esta quinta etapa, la concentración de la biomasa puede alcanzar 27 g/l de medio, el contenido en lípidos totales es de al menos 14 g/l de medio, y el contenido en ácido araquidónico es preferentemente de más de 7,6 g/l de medio.

- 35 Esta quinta etapa tiene por objetivo aumentar el contenido en ácido araquidónico sin afectar a la concentración total de lípidos.

Cuando el pH supera el valor de 7,5, que indica el comienzo de la lisis celular, el reactor se para, el medio de fermentación se pasteuriza durante 30 minutos a 70°C, y después del enfriamiento a 30°C-25°C, los microorganismos se retiran del fermentador por el paso a través de una prensa de filtro.

- 40 Los principales indicadores de este conducto de fermentación están presentes en la tabla I siguiente:

Tabla I.

ES 2 703 520 T3

Etapas	1				2				3						
Tiempo (horas)	0	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96	104	112
PH	6,3	6,1	5,7	6,4	6,8	7,0	7,1	7,1	7,2	7,1	7,1	7,2	7,1	7,2	7,3
DO (%)	1,0	0,8	0,8	0,8	0,7	0,8	0,8	0,8	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,8
RS (%)	3,12	2,77	2,53	1,94	1,51	1,34	1,17	1,10	0,85	0,74	0,74	0,48	0,43	0,31	0,25
Biomasa (g/l)	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	16,1	Nd	Nd	20,7	Nd	Nd	23,5	Nd	Nd	24,3
TL (g/l)	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	4,7	Nd	Nd	8,3	Nd	Nd	10,2	Nd	Nd	10,9
ARA g/l)	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	1,3	Nd	Nd	3,1	Nd	Nd	4,3	Nd	Nd	5,0

Etapas	4			5		
Tiempo (horas)	120	128	136	144	152	160
PH	7,3	7,3	7,4	7,6	7,5	7,5
DO (%)	0,8	0,8	0,9	0,9	0,9	0,9
RS (%)	0,16	0,14	0,12	0,08	0,03	0,02
Biomasa (g/l)	Nd	Nd	25,6	Nd	Nd	27,3
TL (g/l)	Nd	Nd	12,4	Nd	Nd	13,8
ARA g/l)	Nd	Nd	6,2	Nd	Nd	7,6

Nd: no determinado.

El resultado de esta fermentación aparece en la tabla II siguiente

5

Tabla II

Resultado medio medido sobre 10 "lotes" de 85 m³

Duración de la fermentación	165 horas
Volumen final	62 m ³
Contenido en lípidos	12.3 g/l
Contenido en ARA	55%
Contenido en EPA	0,1%
Productividad en ARA bruto	0,04 g/l/h

Ejemplo 2: Recuperación y acondicionamiento de la biomasa de la cepa CNCM I-4642

10

Al final de la quinta etapa de la conducción de fermentación del ejemplo 1, después de que el medio haya sido pasteurizado 30 minutos a 70°C y después del enfriamiento a 30 - 25°C, los microorganismos pueden recuperarse después del medio de fermentación después de la deshidratación mecánica por filtración bajo prensa.

Después de la filtración y del lavado con agua limpia (0,5 V de agua / 1 V de medio), la cantidad de materia seca de la torta de biomasa es del 65 al 75%.

ES 2 703 520 T3

En una segunda etapa, la torta de biomasa se granula en partículas de 0,5 a 1,5 cm², después las partículas son secadas utilizando un secador de lecho fluidizado.

El tiempo de secado es de aproximadamente 45 a 55 minutos con una temperatura de entrada de aire dispuesta a 150°C.

- 5 Cuando la temperatura del aire de salida supera los 95 a 100°C, la entrada de aire se detiene.

La biomasa se enfría a la temperatura ambiente y la biomasa se almacena en saco de 25 kg bajo nitrógeno para limitar la oxidación.

La composición de la biomasa se presenta en la tabla III siguiente.

Tabla III.

Resultado medio sobre 10 "lotes" de 85 m³

Biomasa seca (kg)	1650 (rendimiento de recuperación del 98%)
Humedad (%)	6
Lípidos totales (g/100g)	44 (682 Kg/lote)
ARA (%)	52 (355 kg/lote)

10

Ejemplo 3. Extracción del aceite bruto a partir de la biomasa secada y granulada.

La tecnología consiste en extraer el aceite por afinidad con un disolvente líquido.

El aceite se extrae de los granulados obtenidos en el ejemplo 2 utilizando butano líquido bajo presión de 6 a 7 bares.

- 15 Para optimizar el rendimiento de extracción, la biomasa se mezcla sucesivamente siete veces con un disolvente fresco reciclado, y cada vez el tiempo de contacto es de 50 a 60 min.

El rendimiento de extracción es de más del 85% (y puede alcanzar unos valores comprendidos entre el 90 y el 95%).

El aceite se recupera después de la destilación del disolvente al vacío y del secado (Presión de 0,1 mPa y Temperatura de 70 a 80°C).

La tabla IV siguiente presenta el perfil del aceite bruto obtenido.

- 20 Tabla IV.

Resultado medio sobre 10 "lotes" de 85 m ³	
Rendimiento de la extracción (%)	86
Humedad (%)	0,1
Lípidos totales (g/100g)	99,9 (585 Kg/lote)
Triglicéridos (% en peso)	87 a 93
Ácidos grasos saturados (% en peso)	20 a 23
ARA (%)	52 (304 kg/lote)
Acidez (mg KOH/g)	2
Índice de peróxidos (meq/kg)	5,5
Contenido en insaponificables (%)	5,3
Fósforo (ppm)	< 100
EPA (%)	0

Ejemplo 4. Refinado y purificación del aceite

1. Fase de refinado

Esta fase de refinado comprende seis etapas sucesivas clásicamente utilizadas por el experto en la materia:

- desengomado: acidificación con ácido cítrico,
- 5 - saponificación: neutralización con álcalis,
- centrifugación para eliminar las gomas y los jabones,
- lavado con agua,
- decoloración con tierra de sílice, carbón activo y arcilla,
- filtración.

10 2. Fase de purificación

Esta fase de purificación tiene como objetivo eliminar los malos sabores, los peróxidos y optimiza la estabilidad del aceite.

Esta fase comprende, sucesivamente, una o dos etapas de:

- destilación molecular (utilizada si el factor UNS es demasiado elevado),
- 15 - desodorización con vapor a alto vacío.

En la totalidad del procedimiento, el rendimiento de purificación es del orden del 78 al 80%, y los indicadores de rendimiento se presentan en la tabla V siguiente:

Tabla V.

Resultado medio sobre 10 "lotes" de 85 m³

Rendimiento de refinado (%)	79
Humedad (%)	≤ 0,01
Lípidos totales (g/100g)	99,99 (462 Kg/lote)
Triglicéridos (peso %)	≥ 90
Ácidos grasos saturados (peso %)	20 a 23
ARA (%)	≥ 50 (231 kg/lote)
Acidez (mg KOH/g)	≤ 1
Índice de peróxidos (meq/kg)	≤ 2
Contenido en insaponificables (%)	≤ 3
Humedad + materias volátiles (%)	≤ 0,1
Impurezas (%)	≤ 0,1
Disolvente residual (ppm)	< 1
PUFA (%)	≥ 65
EPA (%)	0
Trans FA (peso%)	< 1

PUFA: PolyUnsaturated Fatty Acids (ácidos grasos poliinsaturados)

Trans FA: Trans Fatty Acids (ácidos grasos trans)

ES 2 703 520 T3

El aceite final se presenta en forma de un líquido amarillo claro a 40°C, homogéneo y sin impurezas extrañas.

El olor es neutro, sin sabor a rancio.

Se recupera también la fracción volátil de la etapa de desodorización con vapor bajo alto vacío.

- 5 Clásicamente, esta etapa de desodorización se realiza en un reactor específico, en el que el aceite se calienta y sufre un paso a alto vacío a fin de liberar la fracción volátil.

Esta tecnología “discontinua” se utiliza aquí en un reactor de 1200 l con un porcentaje de carga del 50%, bajo atmósfera inerte con nitrógeno.

- 10 El aceite se calienta progresivamente de la temperatura ambiente a 185°C (temperatura llevada por la doble envoltura y por inyección interna de vapor a 190°C).

Después de la estabilización de la temperatura a 185°C, el vacío se realiza progresivamente hasta 260 Pa y se mantiene durante 30 minutos.

La fracción gaseosa liberada por este tratamiento se condensa a temperatura ambiente y se recoge por un ciclón externo.

- 15 La composición de esta fracción se determina por:

- espectrometría infrarroja y de RMN del protón a 25°C, en solución en CDCL₃+CD₃OD y fósforo a 25°C en solución en CDCL₃+CD₃OD + tampón pH 7, y

- cromatografía en fase gaseosa según la F-CPG-043 para los ácidos grasos totales.

- 20 La fracción está constituida principalmente de triglicéridos (contenido estimado a aproximadamente un 80%), siendo el escualeno detectado a una altura del 10%.

El perfil de los ácidos grasos es el siguiente:

NOMENCLATURA	NOMENCLATURA ABREVIADA		g/100g bruto
	Química	Fisiología	
Láurico	C12:0		< 0,1
Mirístico	C14:0		< 0,3
Pentadecílico	C15:0		< 0,1
Palmítico	C16:0		5,6
Palmitoleico	C16:1 Δ9c		< 0,3
Esteárico	C18:0		8,5
Oleico	C18:1 Δ9c	n-9 (w9)	7,0
linoleico (LA),	C18:2 Δ9c, 12c	n-6 (w6)	9,3
γ-linolénico (GLA)	C18:3 Δ6c, 9c, 12c	n-6 (w6)	2,1
α-linolénico (ALA),	C18:3 Δ9c, 12c, 15c	n-3 (w3)	< 0,3
Araquídico	C20:0		0,9
Estearidónico (SDA, STD)	C18:4 Δ6c, 9c, 12c, 15c	n-3 (w3)	<0,1
Gondoico	C20:1 Δ11c	n-9 (w9)	<0,3
Ácido dihomo-gamma-linolénico acid (DGLA)	C20:3 Δ8c, 11c, 14c	n-6 (w6)	1,6
araquidónico (AA)	C20:4 Δ5c, 8c, 11c, 14c	n-6 (w6)	39,2

ES 2 703 520 T3

(ETE)	C20:3 Δ 11c, 14c, 17c	n-3 (w3)	<0,1
Behénico	C22:0		1,7
Timnodónico (EPA)	C20:5 Δ 5c, 8c, 11c, 14c, 17c	n-3 (w3)	<0,3
Lignocérico	C24:0		2,1
(Ácido Osbond)	C22:5 Δ 4c, 7c, 10c, 13c, 16c	n-6 (w6)	< 0,1
Nervónico	C24:1 Δ 15c	n-9 (w9)	< 0,1
Clupanodónico (DPA)	C22:5 Δ 7c, 10c, 13c, 16c, 19c	n-3 (w3)	< 0,1
Cervónico (DHA)	C22:6 Δ 4c, 7c, 10c, 13c, 16c, 19c	n-3 (w3)	< 0,1
	otros		
	total		78,5

Límite de cuantificación: 0,3%/bruto

Límite de detección: 0,1%/bruto

Ejemplo 5. Estudio comparativo del perfil lipídico del aceite conforme a la descripción con respecto a los de los aceites del comercio o descritos en la bibliografía

- 5 Los ácidos grasos se determinaron por cromatografía en fase gaseosa en la forma de ésteres metílicos después de la transesterificación con metanol clorhídrico y extracción con cloroformo. Los resultados se expresan en distribución, en %; el análisis se realiza mediante el método de normalización interna.

Se ha utilizado un cromatógrafo (tipo VARIAN 3800) equipado de un inyector Split-splitless provisto de un forro de en foque (tapfocus liner) y de un detector de ionización de llama.

- 10 Se ha preparado una solución de patrón interno tiene aproximadamente 0,5 mg de metilheptadecanoato por ml de metanol. El metilheptadecanoato ha servido de punto de referencia cromatográfico.

En un tubo de 6 ml, se han pesado alrededor de 30 mg de muestra seca previamente. Se ha añadido a la pipeta de 2 marcas 1 ml de la solución de patrón interno y después 2 ml de metanol clorhídrico 3N. Se ha taponado después y colocado en baño seco con termostato a 110°C durante 4 h.

- 15 Después del enfriamiento, se ha añadido aproximadamente 0,5 ml de agua y 0,5 ml de agua saturada en cloruro de sodio, extraída por 3 veces 1 ml de cloroformo. Se han recuperado las fases clorofórmicas en un tubo de 6 ml secándolas sobre una columna que contiene sulfato de sodio. Se ha concentrado bajo corriente de nitrógeno hasta 1 ml aproximadamente y se ha inyectado.

- 20 La distribución de cada ácido graso (i), en %, se ha obtenido por la relación de la superficie del pico de este ácido graso con respecto a la suma de las superficies de todos los picos referenciados sobre el cromatograma, del ácido láurico (C12:0) a DHA (C22:6 Δ 4c, 7c, 10c, 13c, 16c, 19c) incluido, excluyendo el pico del metilheptadecanoato.

Los aceites analizados según este método (en la tabla VI siguiente), además de los de la descripción, son unos aceites comercializados por las compañías CARGILL, FUXING y SUNTORY.

- 25 Como control se presentan los perfiles en ácidos grasos de los aceites extraídos de *M. carmagensis* y *M. schmuckeri* descritos en la bibliografía.

Los aceites ricos en araquidónico conformes a la descripción presentan:

- más del 50% de ARA

- un contenido en EPA del orden del 0,1%

- 30 - y sobre todo, con respecto a los otros aceites procedentes de microorganismos del mercado o descritos en la bibliografía, menos del 0,5%, preferentemente menos del 0,2% de ácido mirístico (C14:0), menos del 9%, preferentemente menos de 7% de ácido palmítico (C16:0), menos del 3%, preferentemente menos del 2,5% de ácido behénico (C22:0) y menos del 3%, preferiblemente menos del 2,5% de ácido lignocérico (C 24:0).

Codificación ácidos grasos	Aceite extraído de la cepa CTCM I-4642	CARGILL	FUXING	SUNTORY	EP726321 M. schmuckeri	EP726321 M. camargensis -CSL	EP726321 M. camargensis + CSL
	% de superficie						
Ácido mirístico C14:0	0,1	0,4	0,3	0,4	0,3	0,5	0,5
Ácido palmítico C16:0	6,7	6,8	7,5	12,3	13,5	19,7	16,7
Ácido palmitoleico C16:1	0,3		0,4	0,08	0,6	0,4	0,3
Ácido esteárico C18:0	10,0	6,1	5,1	7,9	8,0	4,9	8,4
Ácido oleico C18:1	8,6	5,6	3,3	6,1	11,8	17,0	7,8
Ácido linoleico (LA) C18:2	9,3	8,3	2,8	9,0	10,8	14,2	14,3
Ácido α -linolénico (GLA) C18:3	2,6	2,3	2,7	2,3	4,1	6,0	7,7
Ácido araquídico C20:0	1,2	ND	0,8	0,8	ND	ND	ND
Ácido gondoico C20:1	0,5	ND	0,3	0,4	0,3	0,9	0,4
Ácido Eicosadienoico C20:2	0,5	ND	0,5	0,7	0,6	0,5	0,9
Ácido dihomo-gamma-linolénico C20:3	1,8	3,8	4,2	0,6	0,5	2,2	0,5
Ácido araquidónico C20:4	50,4	41,3	48,3	46,2	40,3	24,7	30,0
Ácido timnodónico (EPA) C20:5	0,1	0,2	0,1	ND	ND	0	0,1
Ácido behénico C22:0	2,4	3,3	3,5	3,0	5,2	3,6	7,8
Ácido lignocérico C24:0	2,3	9,8	10,8	8,2	2,8	4,4	3,8

ND: No Detectado

Ejemplo 6: Caracterización de la biomasa residual obtenida después de la etapa de extracción del aceite

5 Después de las etapas de refinado y de purificación del ejemplo 4, la biomasa residual obtenida presenta una materia seca comprendida entre el 85 y el 95%.

Unos análisis son entonces llevados a cabo a fin de determinar el contenido en:

- nitrógeno total (determinación del % en N 6,25)

- lípidos totales,

- azúcares totales,

10 - fibras solubles

y también:

- la distribución de ácidos grasos residuales,

- el perfil de los azúcares residuales,

- el aminograma.

ES 2 703 520 T3

La tabla VII siguiente presenta el perfil de 5 lotes de biomasa residual.

Biomasa ARA	Unidades	lote 1	lote 2	lote 3	lote 4	lote 5
Materia seca	%	87,60	90,90	91,20	91,70	90,90
Nx6,25	%/bruto	33,80	36,20	37,30	36,50	36,50
Residuo de la calcinación	%/bruto	4,50	4,70	4,80	4,60	4,70
Lípidos totales	%/bruto	12,10	12,10	11,50	11,80	12,70
Fibras (método PROSKY)	%/bruto	23,20	23,00	25,00	26,40	24,10
Perfil en ácidos grasos						
C12:0 láurico	%/bruto	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03
C14:0 mirístico	%/bruto	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
C15:0 pentadecílico	%/bruto	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03
C16:0 palmítico	%/bruto	1,40	1,40	1,20	1,40	1,40
C16:1 Δ9c palmitoleico	%/bruto	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
C18:0 esteárico	%/bruto	1,00	1,10	1,00	1,10	1,10
C18:1 Δ9c oleico	%/bruto	1,10	1,20	0,90	1,20	1,20
C18:2 Δ9c, 12c linoleico (LA)	%/bruto	0,90	1,00	0,80	1,00	0,90
C18:3 Δ9c, 12c, 15c α-linolénico (ALA)	%/bruto	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03
C18:3 Δ6c, 9c, 12c γ-linolénico (GLA)	%/bruto	0,50	0,50	0,40	0,50	0,50
C18:4 Δ6c, 9c, 12c, 15c estearidónico (SDA, STD)	%/bruto	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03
C20:0 araquídico	%/bruto	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
C20:1 Δ11c gondoico	%/bruto	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
C20:3 Δ8c, 11c, 14c dihomog-linolénico (DGLA)	%/bruto	0,30	0,30	0,20	0,30	0,30
C20:3 Δ11c, 14c, 17c (ETE)	%/bruto	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03
C20:4 Δ5c, 8c, 11c, 14c araquidónico (AA)	%/bruto	4,40	4,00	4,50	3,80	4,20
C20:5 Δ5c, 8c, 11c, 14c, 17c timnodónico (EPA)	%/bruto	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03
C22:0 behénico	%/bruto	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
C22:5 Δ7c, 10c, 13c, 16c, 19c clupanodónico (DPA)	%/bruto	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03
C22:5 Δ4c, 7c, 10c, 13c, 16c (Ácido Osbond)	%/bruto	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03
C22:6 Δ4c, 7c, 10c, 13c, 16c, 19c cervónico (DHA)	%/bruto	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03
C24:0 lignocérico	%/bruto	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
C24:1 Δ15c nervónico	%/bruto	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03
Otros ácidos grasos	%/bruto	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10

ES 2 703 520 T3

∑ AGT	%/bruto	10,60	10,50	10,00	10,30	10,60
Perfil en azúcares						
Arabinosa	%/bruto	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Galactosa	%/bruto	1,20	1,00	1,00	1,10	1,10
Glucosa	%/bruto	13,50	15,90	15,00	16,10	15,10
Manosa	%/bruto	1,70	1,80	1,90	1,80	1,90
Ramnosa	%/bruto	nd	nd	nd	nd	nd
Ribosa	%/bruto	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
Xilosa	%/bruto	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
∑ Azúcares totales	%/bruto	16,80	19,10	18,30	19,40	18,50
Aminograma						
Ácido aspártico	%/bruto	2,06	2,34	2,41	2,42	2,35
Ácido glutámico	%/bruto	2,82	3,15	3,13	3,19	3,06
Alanina	%/bruto	1,40	1,56	1,44	1,58	1,48
Arginina	%/bruto	1,68	2,00	2,39	1,98	2,21
Cistina	%/bruto	0,39	0,43	0,48	0,44	0,45
Glicina	%/bruto	1,07	1,23	1,16	1,21	1,17
Histidina	%/bruto	1,08	1,24	1,21	1,23	1,13
Isoleucina	%/bruto	0,94	1,06	0,99	1,05	1,01
Leucina	%/bruto	2,40	2,78	3,12	2,73	2,71
Lisina	%/bruto	2,05	2,38	2,39	2,34	2,31
Metionina	%/bruto	0,49	0,51	0,44	0,47	0,45
Fenilalanina	%/bruto	1,64	1,90	2,03	1,87	1,81
Prolina	%/bruto	0,89	1,02	1,07	1,10	1,08
Serina	%/bruto	1,10	1,27	1,28	1,27	1,25
Treonina	%/bruto	1,17	1,29	1,31	1,32	1,30
Triptofano	%/bruto	0,65	0,69	0,93	0,71	0,74
Tirosina	%/bruto	0,87	0,96	1,05	1,00	1,01
Valina	%/bruto	1,33	1,47	1,53	1,48	1,46
∑ AAT	%/bruto	24,00	27,30	28,40	27,40	27,00
Contenido en metales pesados						
Plomo	mg/kg	0,04	0,04	0,05	0,04	0,03

ES 2 703 520 T3

Cadmio	mg/kg	0,06	0,07	0,07	0,06	0,07
Mercurio	mg/kg	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Arsénico	mg/kg	0,12	0,11	0,11	0,11	0,11
Zinc	mg/kg	22	23	23	22	25
Cromo	mg/kg	8,9	2	1,4	1,2	2
Manganeso	mg/kg	6,8	6,9	6,9	6,6	7

5 La biomasa residual aparece por lo tanto perfectamente adaptada a su aplicación en utrición animal, tanto por su contenido en nitrógeno proteico (entre 35 y 45%), su contenido en fibras solubles (entre 20 y 30%), en azúcares residuales (entre 15 y 20%) y para algunas especies específicas (animales domésticos, acuicultura), para su contenido residual en ARA (entre 3,5 y 4,5).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ROQUETTE FRERES

<120> ACEITE ENRIQUECIDO EN ÁCIDO ARAQUIDÓNICO PROCEDENTE DE MICROORGANISMOS (HONGO UNICELULAR MORTIERELLA ALPINA) Y SU PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN

10 <130> B1392PC

<160> 1

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 361

15 <212> ADN

<213> *Mortierella alpina*

<400> 1

```

ttaaacagtg cgtgaaattg ttgaaagga aacgcttgac accagtcacg cgagcggaaa      60
atcagtcctt tgcaagtggg agttgtgtgg gttcggaccg caaggccggc ctgtgctgca      120
tctctgctgt aagtgatgca ctttttcggt tgcaggcaa catcagtttc ttctgctgga      180
caaaactctt gagaaggtag cagctttggc tgtgttatag ctcttgagcg atacagtgga      240
ggggactgag gttttcgcag cgcgtgctct cgggcaaggc tgattgggtg ctatgggatc      300
gttcggtgta caatgcatgc attttgccc gtgtcttttc tgtactcgct caactcggct      360
c                                                                                   361

```

REIVINDICACIONES

1. Cepa de *Mortierella alpina* depositada el 12 de junio de 2012 en la CNCM bajo el número I-4642.
2. Método de producción de los compuestos lipídicos de interés que comprende un cultivo de la cepa según la reivindicación 1 y la recuperación de la biomasa rica en compuestos lipídicos de interés y, facultativamente, la recogida de los compuestos lipídicos de interés.
3. Método según la reivindicación 2, en el que el compuesto lipídico de interés es el ácido araquidónico (o ARA).
4. Método según la reivindicación 3, en el que el ácido araquidónico (ARA) se presenta en forma de un aceite.
5. Método según la reivindicación 4, caracterizado por que el aceite que contiene el ácido araquidónico se prepara mediante un método que comprende:
 - 10 * cultivar la cepa en condiciones heterotrópicas a fin de producir una biomasa que presenta entre el 40 y el 55% en peso de lípidos, preferiblemente entre el 40 y el 50% en peso de lípidos, más preferiblemente aún del orden del 45% en peso de lípidos y entre el 50 y el 55% en peso de ARA con respecto al peso de ácidos grasos totales,
 - * recoger la biomasa así preparada,
 - * secar dicha biomasa,
 - 15 * extraer el aceite por disolvente seleccionado del grupo constituido del hexano y del butano, más particularmente por butano líquido, y
 - * realizar el refinado y recuperar el aceite así extraído.
6. Utilización de la cepa según la reivindicación 1, para producir unos compuestos lipídicos de interés, tal como el ácido araquidónico (o ARA).
7. Producto o composición que comprende la cepa según la reivindicación 1, o un lisado de es rico en compuesto lipídico de interés, caracterizado por que es rico en ácido araquidónico (o ARA) y que comprende más del 50% de ácido araquidónico (o ARA) en peso sobre ácidos grasos totales, y presenta:
 - 20 - menos del 0,5%, preferentemente menos del 0,2% de EPA,
 - menos del 0,5%, preferentemente menos del 0,2% de ácido mirístico (C14:0),
 - 25 - menos del 9%, preferentemente menos del 7% de ácido palmítico (C16:0),
 - menos del 3%, preferentemente menos del 2,5% de ácido behénico (C22:0) y
 - menos de 3%, preferiblemente menos de 2,5% de ácido lignocérico (C 24:0).
8. Producto o composición según la reivindicación 7, caracterizado por que se trata de un producto alimentario o complementario alimentario.
9. Método de preparación de una cepa de *Mortierella alpina* capaz de producir unos contenidos en ácido araquidónico de más del 50% en peso sobre ácidos grasos totales que comprende la mutagénesis o la transformación génica de la cepa según la reivindicación 1.