(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 804 757**

(51) Int. CI.:

C12P 7/64 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
A23K 20/158 (2006.01)
A23K 50/40 (2006.01)
A23K 50/80 (2006.01)
A23L 33/12 (2006.01)
C11B 1/10 (2006.01)
C11B 3/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.01.2008 PCT/JP2008/050313**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **24.07.2008 WO08087921**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.01.2008 E 08703177 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2020 EP 2119791**

(54) Título: **Métodos para producir ácido graso poliinsaturado y lípido que contiene ácido graso poliinsaturado**

(30) Prioridad:

15.01.2007 JP 2007006293

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.02.2021

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

KATANO, KENJI y
KAWASHIMA, HIROSHI

(74) Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

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

Métodos para producir ácido graso poliinsaturado y lípido que contiene ácido graso poliinsaturado

Campo técnico

La presente invención se refiere a métodos para producir los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), ácido araquidónico (ARA) y/o ácido dihomo-gamma-linoleico (DGLA). En particular, la presente invención se refiere a métodos para producir un lípido con un alto contenido de ácido dihomo-gamma-linolénico (DGLA) o ácido araquidónico (ARA).

Técnica anterior

Los ácidos grasos poliinsaturados (en adelante denominados PUFA) tienen una variedad de funciones fisiológicas útiles. Los PUFA en la presente memoria se refieren a ácidos grasos que contienen 20 o más átomos de carbono y que tienen dos o más dobles enlaces. En los últimos años, se ha encontrado que los PUFA, en particular, el ácido dihomo-gamma-linolénico (en lo sucesivo denominado DGLA) y el ácido araquidónico (en lo sucesivo denominado ARA) son útiles de diversas maneras (Bibliografía No Relacionada con Patentes 1). Por ejemplo, se ha encontrado que DGLA tiene un efecto inhibidor sobre la dermatitis atópica y un efecto antialérgico y que ARA tiene un efecto de mejora de la función cerebral y un efecto nutritivo para los bebés. Además, existe preocupación por la falta de DGLA y ARA en pacientes afectados por enfermedades de adultos, incluidos pacientes potenciales, bebés, personas mayores y mascotas (en particular, animales de la familia de los félidos).

En tales circunstancias, se han llevado a cabo diversas investigaciones sobre el suministro de PUFA, en particular DGLA o ARA. El cultivo de microorganismos capaces de producir tales ácidos grasos se ha estudiado como procedimiento práctico. También se han llevado a cabo varias investigaciones sobre tales procedimientos para encontrar un procedimiento adecuado para la producción industrial (Bibliografía No Relacionada con Patentes 1 y Bibliografía Relacionada con Patentes 4). Para los PUFA (en particular, DGLA), se encontró un método de cultivo a gran escala que producía hasta 167 g de DGLA por 1 kg de células microbianas secas (Bibliografía Relacionada con Patentes 1 y Bibliografía No Relacionada con Patentes 2). Sin embargo, en estos métodos, la división del medio de cultivo y la adición de glucosa deben repetirse con frecuencia durante al menos varios días desde el comienzo del cultivo para evitar una baja productividad debido al consumo de una gran cantidad de glucosa durante el comienzo del cultivo y a la inhibición del crecimiento que resulta de una alta concentración de glucosa.

Además, se han estudiado métodos de cultivo para microorganismos para mejorar la productividad de determinadas sustancias. La Bibliografía Relacionada con Patentes 2 describe un método para cultivar Kluyveromyces lactis en un medio de cultivo que contiene suero para producir cerebrósido por fermentación, que incluye la adición de diversas fuentes de sodio al medio de cultivo y el control del pH del medio de cultivo.

Además, con el cultivo del género Mortierella (hongo filamentoso), la Bibliografía Relacionada con Patentes 3 describe un método para controlar el pH utilizando NH_4OH, que también se utiliza como fuente de nitrógeno, mientras que la Bibliografía Relacionada con Patentes 3 describe el control del pH dentro del intervalo de 7 a 7,5 en la última mitad del período de cultivo. La Bibliografía No Relacionada con Patentes 4 describe que la adición de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ al 0,05%, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ al 0,05% y Na_2SO_4 al 0,1% junto con KH_2PO_4 a un medio de cultivo conduce a hongos en una forma óptima y un aumento en la productividad de PUFA.

[Bibliografía Relacionada con Patentes 1] Patente japonesa Núm. 3354581
[Bibliografía Relacionada con Patentes 2] JP-A-2006-55070
[Bibliografía Relacionada con Patentes 3] USP Núm. 5.658.767
[Bibliografía Relacionada con Patentes 4] US-A1-2006/0174376

[Bibliografía No Relacionada con Patentes 1] Hiroshi Kawashima, Food Food Ingredients J Jpn, 210, 106-114 (2005)
[Bibliografía No Relacionada con Patentes 2] H Kawashima et al., J Am Oil Chem Soc, 77, 1135-1138 (2000)
[Bibliografía No Relacionada con Patentes 3] Byung-Hae Hwang et al., Biotechnol Lett, 27, 731-5 (2005)
[Bibliografía No Relacionada con Patentes 4] Shigeaki Fujikawa et al., Bioscience and Industry, 57, 818-821 (1999)

Descripción de la invención

Problemas a resolver por la invención

Como se mencionó anteriormente, se han llevado a cabo diversas investigaciones sobre métodos para producir PUFA, en particular DGLA y ARA mediante el cultivo de microorganismos capaces de producir ácidos grasos. Sin

embargo, las células microbianas obtenidas por estos métodos convencionales tienen la desventaja de que el contenido de PUFA en las células microbianas es bajo. Las células microbianas que contienen PUFA se pueden añadir a alimentos y bebidas, composiciones nutricionales, forrajes o alimentos para mascotas sin más procedimiento después del secado. Sin embargo, con un bajo contenido de PUFA en las células microbianas, se debe añadir una gran cantidad de células microbianas para lograr un efecto suficiente de PUFA, lo que da como resultado contenidos significativamente limitados de otros componentes añadidos. Además, las células microbianas que contienen PUFA se pueden utilizar como un material de bajo contenido para extraer un lípido que contenga PUFA. Sin embargo, con bajos contenidos de PUFA en las células microbianas, se debe procesar una gran cantidad de células microbianas, lo que requiere un dispositivo de extracción a gran escala y una gran cantidad de disolvente de extracción. Esto causará mayores costes y un mayor consumo de energía para el procesamiento que causará una carga ambiental significativa.

En los métodos convencionales anteriores, también se han intentado varios métodos para controlar el cultivo de células microbianas. Dado que un procedimiento de cultivo complicado conduce a contaminación, riesgo de errores de manipulación y aumento de los costes, es importante realizar el cultivo de manera eficaz a través de procedimientos minimizados, que incluyen la adición de aditivos a un medio de cultivo.

La presente invención se realizó en vista de la situación mencionada anteriormente. Un objeto de la presente invención es proporcionar un método de bajo coste que sea fácil de gestionar y adecuado para la producción a gran escala de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), ácido araquidónico (ARA) y/o ácido dihomo-gamma-linolénico (DGLA).

Medios para resolver los problemas

Hasta ahora, la adición de grasa, aceite y sales a un medio de cultivo basal ha sido investigada como una técnica de cultivo para aumentar la productividad de PUFA a partir de hongos filamentosos del género Mortierella, pero la adición de ácidos orgánicos para encontrar un aumento en el contenido de PUFA nunca se ha intentado, aunque se ha realizado el intento de utilizar ácidos orgánicos en otros microorganismos. Además, no se ha informado en detalle del control óptimo del pH durante el cultivo. Por otra parte, nadie ha llamado la atención sobre los efectos de una combinación de adición de ácidos orgánicos y control del pH en la producción de PUFA, aunque se sabe que la adición de ácidos orgánicos naturalmente causa una reducción en el pH.

Además, con el contenido de sales metálicas añadidas en cantidades traza a un medio de cultivo, por ejemplo, la Bibliografía No Relacionada con Patentes 4 que utiliza $CaCl_2$ y $MgCl_2$ se centra principalmente en los efectos únicos de Ca^{2+} y Mg^{2+}, pero no en los efectos de los aniones emparejados con los iones metálicos. En consecuencia, nadie se ha centrado en los efectos de los aniones emparejados con los iones metálicos sobre la productividad de PUFA a partir de microorganismos.

En un procedimiento de adición de aditivos a un medio de cultivo basal, el medio de cultivo generalmente se esteriliza térmicamente antes del cultivo. Sin embargo, la esterilización generalmente no se lleva a cabo después de mezclar glucosa y otros compuestos debido a la alta posibilidad de inducción de una reacción química. Por lo tanto, la adición de aditivos distintos de la glucosa a un medio de cultivo al comienzo del cultivo complica significativamente el procedimiento de cultivo. En consecuencia, el procedimiento de adición se debe simplificar tanto como sea posible con la condición de que se evite la esterilización simultánea de glucosa y otros compuestos, que causan fácilmente una reacción química.

Los autores de la presente invención han estudiado exhaustivamente para resolver los problemas anteriores y han descubierto que, en un método para producir los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), ácido araquidónico (ARA) y/o ácido dihomo-gamma-linolénico (DGLA), que implica el cultivo celular con agitación centrífuga y aireación de Mortierella Alpina en un medio de cultivo líquido, el contenido del lípido producido en una célula microbiana, y de PUFA, en particular DGLA y ARA, en el lípido se puede aumentar drásticamente por medio de una de las siguientes etapas: (a) adición de un ácido orgánico seleccionado del grupo que consiste en ácido succínico, ácido fumárico, ácido pirúvico y ácido málico, o una mezcla de los mismos al medio de cultivo en una cantidad de 0,01 a 5% p/v tres días o más tarde después del comienzo del procedimiento de cultivo, o adicionalmente mediante (b) el aumento del pH del medio de cultivo al intervalo de 6,9 a 7,2 tres días o más tarde después del comienzo del cultivo principal; o adicionalmente (c) adición de un sulfato metálico seleccionado del grupo que consiste en MgSO4, CaSO4, K2SO4, FeSO4 y MnSO4, o una mezcla de los mismos al medio de cultivo. Además, los autores de la presente invención investigaron más a fondo la coordinación de las etapas (a) a (c), descubrieron que las etapas (a), adición de ácido orgánico y (b), el control del pH del medio de cultivo, se pueden llevar a cabo en el mismo tiempo, y completaron la presente invención.

La presente invención proporciona un método para producir ácido araquidónico (ARA) y/o ácido dihomo-gamma-linolénico (DGLA), preferiblemente DGLA, que incluye el uso de un cultivo, preferiblemente un cultivo con agitación centrífuga y aireación de *Mortierella alpina* capaz de producir ARA y/o DGLA, en un medio de cultivo líquido,

incluyendo el método al menos la etapa (a) y opcionalmente las etapas adicionales (b) y/o (c):

(a) adición de ácido orgánico seleccionado entre ácido succínico, ácido fumárico, ácido pirúvico y ácido málico, lo más preferiblemente ácido succínico a un medio de cultivo en una cantidad de 0,01 a 5% p/v, deseablemente de 0,2 a 5% p/v, preferiblemente de 0,22 a 5% p/v, más preferiblemente 0,3 a 5% p/v, lo más preferiblemente de 0,44 a 5% p/v tres días o más tarde después del comienzo del cultivo principal, deseablemente durante una fase de acumulación de ácidos grasos, preferiblemente cuatro días o más tarde, después del comienzo del cultivo principal;
(b) aumentar el pH del medio de cultivo a un intervalo eficaz para el cultivo, deseablemente al intervalo de 6 a 8, preferiblemente de 6,3 a 7,5, más preferiblemente de 6,6 a 7,5, lo más preferiblemente de 6,9 a 7,2 tres días o más tarde después del comienzo del cultivo principal, deseablemente durante la fase de acumulación de ácido graso, preferiblemente en 24 horas o más tarde, más preferiblemente en tres días o más tarde, más preferiblemente en cuatro días o más tarde, después del comienzo del cultivo principal; y
(c) adición de un sulfato metálico, preferiblemente al menos un sulfato metálico seleccionado entre $MgSO_4$, $CaSO_4$, Na_2SO_4, K_2SO_4, $FeSO_4$ y $MnSO_4$, más preferiblemente $MgSO_4$ y/o $CaSO_4$, en una cantidad de 0,01 a 0,5% p/p, preferiblemente de 0,01 a 0,25% p/p, más preferiblemente de 0,05 a 0,2% p/p, lo más preferiblemente de 0,06 a 0,1% p/p al medio de cultivo principal, siendo añadidos estos sulfatos adecuadamente en lugar de los cloruros metálicos correspondientes al medio de cultivo.

La presente invención también proporciona el método que incluye las etapas (a) y (b), en donde las etapas (a) y (b) se llevan a cabo preferiblemente el mismo día, más preferiblemente al mismo tiempo, y en diferentes momentos, preferiblemente en diferentes días desde la adición de una fuente de carbono tal como glucosa al medio de cultivo.

La presente invención también proporciona el método que incluye la etapa (c), en donde la etapa (c) se lleva a cabo antes del comienzo del cultivo principal.

También se describe un método en donde el contenido de DGLA en los ácidos grasos totales preparados es de 35% p/p o más, preferiblemente 37% p/p o más, más preferiblemente 40% p/p o más en el PUFA o el lípido que contiene el PUFA.

También se describe una célula seca de Mortierella alpina, en donde el contenido de DGLA en un gramo de células secas es de 190 mg o más, preferiblemente 195 mg o más, más preferiblemente 200 mg o más, lo más preferiblemente 220 mg o más. La célula seca de Mortierella alpina se pueden preparar secando una célula microbiana de Mortierella alpina que se prepara mediante el método de cultivo anterior en un medio de cultivo líquido, incluyendo el método al menos la etapa (a):

(a) adición de al menos un ácido orgánico seleccionado entre ácido succínico, ácido fumárico, ácido pirúvico y ácido málico, preferiblemente ácido succínico al medio de cultivo en una cantidad de 0,2 a 5% p/v, preferiblemente de 0,22 a 5% p/v %, más preferiblemente de 0,3 a 5% p/v, lo más preferiblemente de 0,44 a 5% p/v tres días o más tarde, preferiblemente cuatro días o más tarde, después del comienzo del cultivo principal;
(b) aumento del pH del medio de cultivo al intervalo de 6,9 a 7,2, tres días o más tarde, preferiblemente cuatro días o más tarde, después del comienzo del cultivo principal; y
(c) adición de al menos un sulfato de metal seleccionado entre $MgSO_4$, $CaSO_4$, Na_2SO_4, K_2SO_4, $FeSO_4$ y $MnSO_4$, preferiblemente $MgSO_4$ y/o $CaSO_4$ en una cantidad de 0,05 a 0,2% en peso, preferiblemente de 0,06 a 0,1% en peso al medio de cultivo principal, añadiéndose adecuadamente estos sulfatos en lugar de los cloruros metálicos correspondientes al medio de cultivo.

La presente descripción también describe alimentos y bebidas, preferiblemente suplementos dietéticos, bebidas, forrajes para animales, más preferiblemente forrajes para animales (en particular, alimentos para mascotas) que contienen la célula seca mencionada anteriormente o ARA y/o DGLA derivados de la célula seca.

Además, por medio del método de la presente invención mencionado anteriormente, se preparan ARA y/o DGLA. Además, por medio del método, el contenido de DGLA resultante en un gramo de célula microbiana seca se incrementa en al menos 3%, preferiblemente al menos 5%, más preferiblemente al menos 10%, en comparación con un método que no incluye las etapas (a) a (c).

Además, por medio del método, el contenido de ARA resultante en un gramo de célula microbiana seca se incrementa en comparación con un método que no incluye las etapas (a) a (c).

Además, por medio del método, el contenido de DGLA en 1 mL del medio de cultivo después del final del cultivo es de al menos 5,5 mg, preferiblemente al menos 6,5 mg, más preferiblemente al menos 7,0 mg, lo más preferiblemente al menos 7,5 mg.
Además, por medio del método, el contenido de DGLA en 1 mL del medio de cultivo después del final del cultivo se

incrementa en al menos 5%, preferiblemente al menos 10%, más preferiblemente al menos 15%, en comparación con un método que no incluye las etapas (a) a (c).

Además, mediante el método, se aumenta el contenido de ARA en 1 mL del medio de cultivo después del final del cultivo, en comparación con un método que no incluye las etapas (a) a (c).

Ventajas de la invención

Según un método de la presente invención, el contenido de un PUFA en una célula microbiana o un lípido que contiene un PUFA se incrementa drásticamente. En consecuencia, se pueden utilizar una célula microbiana que contiene un PUFA, un PUFA y un lípido que contiene un PUFA de manera eficaz. Además, en la presente invención, dado que la etapa (c) (adición de sulfatos metálicos) se puede llevar a cabo antes del cultivo principal, y la etapa (a) (adición del ácido orgánico) y la etapa (b) (control del pH del medio de cultivo) se pueden llevar a cabo después del tiempo requerido para la adición de glucosa al comienzo del cultivo principal, se puede evitar un procedimiento complicado para la adición de glucosa el mismo día para estos procedimientos. Como resultado, la presente invención puede proporcionar un método de bajo costo que es fácil de gestionar y adecuado para la producción a gran escala de los PUFA ARA y DGLA.

Breve descripción de los dibujos

Las Fig. 1A a 1C son gráficos que muestran los efectos sobre el contenido de DGLA en los casos en que se controló el pH (a pH 5,0, 5,8, 7,2) los cinco días posteriores al comienzo del cultivo principal de Mortierella alpina S14 en el Ejemplo 4.

Las Fig. 2A a 2C son gráficos que muestran los efectos sobre el contenido de DGLA en los casos en que se controló el pH (a pH 6,6, 6,9, 7,2, 7,5) tres días después del comienzo del cultivo principal de Mortierella alpina S14 en el Ejemplo 5.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

Microorganismos

Los microorganismos que se pueden utilizar en un método de la presente invención son los hongos filamentosos de Mortierella alpina. Los ejemplos específicos de cepas de tales microorganismos incluyen Mortierella alpina IFO8568, ATCC16266, ATCC32221, ATCC42430, CBS219.35, CBS224.37, CBS250.53, CBS343.66, CBS527.72, CBS529.72, CBS608.70 y CBS754.68.

Todas estas cepas están disponibles gratuitamente, por ejemplo, en el Institute of Fermentation, Osaka (IFO), la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) en los Estados Unidos y Central Bureau voor Schimmelcultures (CBS). Además, también se pueden utilizar las cepas aisladas del suelo por el grupo de estudio de la presente invención, por ejemplo, Mortierella alpina 1S-4, así como Mortierella alpina S14 y Mortierella alpina Iz3 derivadas de 1S-4 mediante una operación de mutación ordinaria, tratamiento con nitrosoguanidina.

Además, los ejemplos de microorganismos que se pueden utilizar en un método de la presente invención incluyen mutantes de Mortierella alpina. Por ejemplo, un microorganismo que pertenece al subgénero Mortierella alpina se puede someter a un proceso de mutación para construir cepas mutantes en las que la actividad de la desaturasa o elongasa se reduce, pierde o mejora. La mutación se puede llevar a cabo mediante cualquier mecanismo conocido por los expertos en la técnica. Los expertos en la técnica pueden entender fácilmente si las cepas mutantes tienen la productividad de PUFA deseada o no.

Manejo del cultivo básico

La presente invención proporciona métodos para producir los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) ARA y DGLA.

Los expertos en la técnica pueden seleccionar adecuadamente un método para inocular una célula en un medio de cultivo durante el cultivo de los microorganismos mencionados anteriormente de acuerdo con el procedimiento de cultivo. Específicamente, se inoculan las células nodrizas, esporas y/o hifas de las cepas de microorganismos, una solución de cultivo de siembra preparada por precultivo, o las células nodrizas, esporas y/o hifas recogidas de la solución de cultivo de siembra en un medio de cultivo líquido o sólido para el cultivo.

Los ejemplos de fuentes de carbono en el medio de cultivo utilizado en un método de la presente invención incluyen glucosa, fructosa, xilosa, sacarosa, maltosa, amilógeno, melazas, glicerol, manitol, sacarosa, sorbitol, galactosa y almidón sacarificado. Tales fuentes de carbono se pueden utilizar solas o combinadas. Además, también se pueden utilizar sin restricción las materias primas que contienen estas fuentes de carbono y comúnmente utilizadas por estos expertos en la técnica, por ejemplo, melaza de cítricos, melaza de remolacha, zumo de remolacha o zumo de caña

de azúcar.

Los ejemplos de fuentes de nitrógeno utilizables incluyen fuentes de nitrógeno generalmente utilizadas por los expertos en la técnica, tales como fuentes de nitrógeno natural, p. ej., peptona, extracto de levadura, extracto de malta, extracto de carne, casaminoácido, aguas de infusión de maíz, proteína de soja, soja desgrasada y harina de semillas de algodón; fuentes de nitrógeno orgánico, p. ej., urea; y fuentes de nitrógeno inorgánico, p. ej., nitratos tales como nitrato de sodio y nitrato de amonio, y sales de amonio tales como sulfato de amonio, cloruro de amonio y fosfato de amonio. En particular, se pueden utilizar fuentes de nitrógeno derivadas de la soja, específicamente soja, soja desgrasada, copos de soja, proteína de soja comestible, desechos de tofu, leche de soja y polvo de soja tostado. Por ejemplo, se pueden utilizar semillas de soja desgrasadas desnaturalizadas por calor, más preferiblemente las semillas de soja desgrasadas calentadas a aproximadamente 70 a 90ºC sin componente soluble en etanol, solas o combinadas, o en forma de una combinación con las fuentes de nitrógeno anteriores.

Además, se pueden utilizar opcionalmente el ión fosfato, el ión potasio, el ión sodio, el ión magnesio, el ión calcio, los iones metálicos, por ejemplo, de hierro, cobre, zinc, manganeso, níquel o cobalto, y las vitaminas como fuente de micronutrientes. Opcionalmente, también se puede añadir un agente antiespumante tal como Adecanate.

Las concentraciones de tales componentes en un medio de cultivo no están particularmente limitadas dentro de un intervalo que no inhiba el crecimiento de microorganismos. Prácticamente, la cantidad total de fuentes de carbono a añadir en un medio de cultivo es deseablemente de 0,1 a 40% p/p, preferiblemente de 1 a 25% p/p, y la cantidad total de fuentes de nitrógeno a añadir es de 2 a 15% p/p, preferiblemente de 2 a 10% p/p. Además, se sabe que el crecimiento de microorganismos se puede inhibir cuando la concentración inicial de fuentes de nitrógeno y/o fuentes de carbono es demasiado alta durante el cultivo principal. En una realización preferida, la cantidad inicial de fuentes de carbono a añadir es de 1 a 8% p/p, preferiblemente de 1 a 5% p/p, y la cantidad inicial de fuentes de nitrógeno a añadir es de 0,1 a 8% p/p, preferiblemente de 1 a 6% p/p, y las fuentes de carbono y nitrógeno se añaden en las cantidades que han sido consumidas por los microorganismos durante el cultivo. Se sabe que la esterilización después de mezclar glucosa y otros compuestos tiene una alta posibilidad de inducción de una reacción química, y una alta razón de carbono/nitrógeno conduce a una alta productividad de lípidos a partir de los microorganismos. Así, en una realización particularmente preferida, el cultivo se lleva a cabo, por ejemplo, mediante el suministro continuo solamente de fuentes de carbono a un medio de cultivo.

Además, para aumentar el contenido de un lípido que contiene un PUFA en una célula microbiana, se pueden añadir, por ejemplo, hidrocarburos tales como hexadecano y octadecano; ácidos grasos tales como ácido oleico y ácido linoleico o sus sales, y ésteres de ácido graso (por ejemplo, ésteres etílicos, ésteres de ácido graso y glicerina y ésteres de ácido graso y sorbitán); y grasas y aceites tales como aceite de oliva, aceite de soja, aceite de canola, aceite de semilla de algodón y aceite de coco al medio de cultivo solos o combinados como precursores de ácidos grasos insaturados. Las cantidades de tales precursores que se van a añadir a un medio de cultivo están en el intervalo de 0,001 a 10% p/p, preferiblemente de 0,05 a 10% p/p. Además, estos precursores se pueden cultivar como la única fuente de carbono en un medio de cultivo.

El cultivo puede ser cualquier cultivo convencional de microorganismos, específicamente, cultivo estático, cultivo con agitación o cultivo con agitación centrífuga con aireación. Los ejemplos de métodos de cultivo utilizables incluyen la llamada fermentación por lotes, fermentación semi-continuos, fermentación por lotes repetidos y fermentación continua. Los ejemplos de medios de agitación utilizables incluyen un impulsor (cuchilla agitadora), fermentador de levantamiento por aire, circulación de caldo de fermentación impulsado por bomba y una combinación de los mismos.

El método de la presente invención se puede realizar mediante los métodos de cultivo mencionados anteriormente. En particular, es industrialmente ventajoso llevar a cabo un cultivo principal mediante cultivo con agitación centrífuga con aireación en un medio de cultivo líquido. Por ejemplo, se pueden utilizar recipientes agitados tales como un fermentador de jarra y un tanque para el cultivo con agitación centrífuga con aireación, pero los recipientes no están limitados a los mismos.

Para el cultivo con agitación centrífuga con aireación, por ejemplo, se puede alimentar gas que contiene oxígeno, tal como aire o gas que no contiene oxígeno tal como argón y nitrógeno. Tal gas puede ser seleccionado adecuadamente por personas expertas en la técnica en las condiciones del sistema de cultivo. Por ejemplo, en los procedimientos descritos en los Ejemplos a continuación de Mortierella alpina, el gas que contiene oxígeno, tal como el aire, burbujea a través del medio de cultivo.

La temperatura de cultivo para los microorganismos depende del tipo de microorganismo a utilizar, pero generalmente es de 5 a 40°C, preferiblemente de 20 a 30°C. En una realización, los microorganismos se pueden cultivar a una temperatura de 20 a 30°C para cultivar las células, y se pueden cultivar adicionalmente a una temperatura de 5 a 20°C para producir un lípido que contiene un PUFA. Tal control de temperatura también puede conducir a un aumento en el contenido de PUFA en un lípido que contiene un PUFA.

Cuando los microorganismos se cultivan en un tubo de ensayo o en un matraz (fase de precultivo), el período de cultivo es de al menos tres días, preferiblemente hasta diez días, preferiblemente hasta cinco días, más preferiblemente tres días. El período de cultivo del cultivo principal posterior es generalmente de dos a treinta días, preferiblemente de cinco a veinte días, más preferiblemente de cinco a quince días. El contenido deseado de PUFA y la composición de ácidos grasos pueden ser criterios para determinar el final del cultivo principal. El cultivo principal se puede dividir en los siguientes períodos principales: una fase de crecimiento logarítmico de microorganismos, es decir, un período que implica un aumento en el contenido de células libres de lípidos (el peso seco de células de los microorganismos menos el peso total de ácidos grasos en la célula), y una fase de acumulación posterior de ácidos grasos tales como PUFA, es decir, un período que implica un pequeño cambio en el contenido de células libres de lípidos. La Bibliografía Relacionada con Patentes 4 revela que el cultivo de Mortierella alpina 1S-4 en un tanque de cultivo de 10 kL tiene una fase de crecimiento desde el comienzo del cultivo hasta el segundo día (aumenta el contenido de células libres de lípidos) y una fase posterior de acumulación de ácidos grasos (el contenido de células libres de lípidos no varía sustancialmente). La fase de crecimiento logarítmico y la fase de acumulación de ácidos grasos se pueden determinar de acuerdo con la descripción de la Bibliografía Relacionada con Patentes 4.

Cabe señalar que el pH del medio de cultivo se ajusta al intervalo de 5 a 7, preferiblemente de 5,5 a 6,5 al comienzo del cultivo principal de microorganismos (al añadir el medio de cultivo de siembra).

Ácidos orgánicos

La presente invención proporciona métodos para producir ARA y/o DGLA, que incluye el cultivo de *Mortierella alpina*, incluyendo cada método (a) la adición de un ácido orgánico en una cantidad de 0,01 a 5% p/v a un medio de cultivo tres días o más tarde después del comienzo del cultivo principal. La adición de un ácido orgánico al medio de cultivo se puede llevar a cabo, por ejemplo, según los ejemplos que se describen a continuación.

Los cuatro ácidos orgánicos que se pueden utilizar en la etapa (a) incluyen ácidos orgánicos y sales e hidratos de los mismos. En lo sucesivo, estos se pueden denominar colectivamente "ácidos orgánicos". Los ácidos orgánicos según la reivindicación 1 son compuestos orgánicos que tienen grupos -COOH que no inhiben el crecimiento de microorganismos cuando se añaden en una cantidad de 0,01 a 5% p/v al medio de cultivo. Entre ellos están los ácidos contenidos en la ruta de la glucólisis y sus rutas ramificadas o un ciclo de TCA. La glucólisis y el ciclo de TCA son rutas primarias para la producción de energía a partir de la sustancia de partida glucosa, y para la síntesis de ácidos grasos. En la mayoría de estas rutas están involucrados ácidos orgánicos. Tales ácidos orgánicos se interconvierten a través de la glucólisis, un ciclo de TCA y también sus rutas ramificadas o derivadas. En general, la síntesis de ácidos grasos, que es la primera fase de la síntesis de PUFA, requiere acetil CoA o NADPH producidos en estas rutas, y están estrechamente implicados en las rutas. En consecuencia, la productividad PUFA de los microorganismos variará dependiendo del contenido y el equilibrio de ácidos orgánicos en un medio de cultivo. En particular, cuando los microorganismos se cultivan en un medio de cultivo que contiene ácidos orgánicos, los ácidos orgánicos preferidos pueden aumentar el contenido de PUFA por unidad de peso de una célula microbiana seca, y/o el contenido de PUFA por unidad de volumen del medio de cultivo. Los ácidos orgánicos utilizables son al menos uno de ácido succínico, ácido fumárico, ácido pirúvico y ácido málico (estos son ácidos mono- o di-carboxílicos, cada uno de los cuales contiene de tres a cuatro átomos de carbono y pueden tener un grupo -OH) y sales y hidratos de los mismos. Se utilizan preferiblemente al menos uno de ácido succínico, y ácido málico y sales e hidratos del mismo. Las sales de ácidos orgánicos utilizables son al menos una de sal de sodio, sal de potasio, sal de magnesio, sal de calcio y sal de amoníaco. Se puede determinar si los ácidos orgánicos son preferibles para la adición o no, por ejemplo, mediante la técnica descrita en los Ejemplos a continuación.

Estos ácidos orgánicos se pueden añadir en una cantidad de 0,01 a 5% p/v, deseablemente 0,2% p/v o más, preferiblemente 0,22% p/v o más, más preferiblemente 0,3% p/v o más, lo más preferiblemente 0,44 p/v% o más (en términos del contenido de ácido orgánico libre) en el medio de cultivo. Un contenido de 0,01% p/v o menos puede impedir el logro de un aumento en el contenido de un PUFA o un lípido que contiene un PUFA en los microorganismos mencionados anteriormente. Un contenido de 5% p/v o más puede conducir a la inhibición del crecimiento del microorganismo. Además, se cree que el contenido de un PUFA o un lípido que contiene un PUFA en los microorganismos no aumenta necesariamente en respuesta a un aumento en la cantidad de ácidos orgánicos que se va a añadir que exceda un cierto nivel. Por lo tanto, la cantidad de ácidos orgánicos que se vaya a añadir se puede seleccionar adecuadamente dentro del intervalo que exceda un cierto nivel. En una realización preferida, se puede añadir al medio de cultivo 1% p/v de succinato disódico hexahidratado, que corresponde a 0,44% p/v de ácido succínico. Los ácidos orgánicos, por ejemplo, en forma de solución se pueden añadir al medio de cultivo. Tales soluciones de ácido orgánico se pueden añadir después de ajustar el pH a un valor similar al del medio de cultivo. Alternativamente, el pH de las soluciones de ácido orgánico se puede ajustar a un valor diferente al del medio de cultivo para cambiar el pH del medio de cultivo.

Estos ácidos orgánicos se añaden durante el cultivo principal de microorganismos, tres días o más tarde (no antes) del comienzo del cultivo principal. Dado que se cree que el efecto de la adición de los ácidos orgánicos se produce

durante la fase de acumulación de ácidos grasos, los ácidos orgánicos se añaden a un medio de cultivo después del comienzo del cultivo principal de microorganismos, adecuadamente al comienzo de la fase de acumulación de ácidos grasos después del final de la fase de crecimiento logarítmico, es decir, tres días o más tarde, más preferiblemente en cuatro días o más tarde, después del comienzo del cultivo principal. En particular, los ácidos orgánicos se pueden añadir de tres a cinco días después del comienzo del cultivo principal, por ejemplo, cuatro días después del comienzo del cultivo principal. Además, los ácidos orgánicos se pueden añadir a la vez o en varias veces. Para facilitar el procedimiento, se prefiere la adición a la vez.

pH

La presente invención proporciona métodos para producir un PUFA y un lípido que contiene un PUFA que incluyen el cultivo de los microorganismos mencionados anteriormente, incluyendo cada método (b) el aumento del pH del medio de cultivo a un intervalo eficaz para el cultivo después del comienzo del cultivo principal. El pH del medio de cultivo se puede controlar, por ejemplo, de acuerdo con los Ejemplos descritos a continuación. Se cree que el pH del medio de cultivo durante el cultivo afecta al metabolismo de los microorganismos y, en particular, afecta altamente a la síntesis o desaturación de los ácidos grasos implicados en la cadena de transporte de electrones.

El pH del medio de cultivo se puede controlar mediante mecanismos conocidos por los expertos en la técnica, de modo que el pH sea más alto que el pH del medio de cultivo antes del control y esté dentro de un intervalo que no impida el crecimiento de los microorganismos (dentro de un intervalo eficaz para el cultivo). Por ejemplo, el pH del medio de cultivo se puede aumentar al intervalo de 6 a 8, en vista del pH del medio de cultivo antes del control. Este intervalo es preferiblemente de 6,3 a 7,5, más preferiblemente de 6,6 a 7,5, lo más preferiblemente de 6,9 a 7,2.

El pH se puede controlar preferiblemente con una solución alcalina, por ejemplo, de NaOH, KOH, $NaHCO_3$ o amoniaco. En particular, se puede utilizar preferiblemente una solución de NaOH que esté fácilmente disponible a un precio económico y que pueda tener poco efecto adverso sobre los microorganismos mencionados anteriormente.

Se sabe que el pH del medio de cultivo ajustado a 5 a 7, preferiblemente de 5,5 a 6,5 al comienzo del cultivo principal del microorganismo mencionado anteriormente, generalmente disminuye una vez durante la fase de crecimiento logarítmico de los microorganismos, después vuelve gradualmente al original nivel, y varía ligeramente durante la fase de acumulación de ácidos grasos. El pH del medio de cultivo se controla durante el cultivo principal de los microorganismos mencionados anteriormente, preferiblemente no antes (es decir, después) del comienzo del cultivo principal. Se cree que el efecto del control del pH se produce durante la fase de acumulación de ácidos grasos. Por lo tanto, el pH se controla después del comienzo del cultivo principal de los microorganismos mencionados anteriormente, adecuadamente al comienzo de la fase de acumulación de ácidos grasos después del final de la fase de crecimiento logarítmico, por ejemplo, en 24 horas o más tarde, preferiblemente en tres días o más tarde, más preferiblemente en cuatro días o más tarde después del comienzo del cultivo principal. En particular, se puede llevar a cabo más preferiblemente tres a cinco días después del comienzo del cultivo principal, por ejemplo, cuatro días después del comienzo del cultivo principal. Además, el pH se puede controlar continuamente durante el período desde el comienzo del control de pH hasta el final del cultivo, pero preferiblemente se puede controlar en un momento durante la fase de acumulación de ácidos grasos debido al pequeño cambio en el pH y a la facilidad del procedimiento.

Sales sulfato

La presente invención proporciona métodos para producir los PUFA ARA y/o DGLA en donde el método adicional a la etapa (a) incluye la etapa (c) de adición de un sulfato metálico al medio de cultivo principal en una cantidad de 0,01 a 0,5% p/p. Se puede añadir el sulfato metálico al medio de cultivo de acuerdo con, por ejemplo, los Ejemplos que se describen a continuación.

Los ejemplos de sulfatos metálicos incluyen $MgSO_4$, $CaSO_4$, Na_2SO_4, K_2SO_4, $FeSO_4$ y $MnSO_4$. Entre ellos se prefieren $MgSO_4$ y $CaSO_4$. Tales sulfatos se pueden añadir solos o combinados. Más preferiblemente, se añaden sulfatos tales como $MgSO_4$ y $CaSO_4$ en lugar de los cloruros metálicos correspondientes tales como $MgCl_2$ y $CaCl_2$ al medio de cultivo. También se pueden utilizar los hidratos de los mismos. La cantidad total de hidratos que se puede añadir se encuentra en el intervalo de 0,01 a 0,5% p/p, preferiblemente de 0,01 a 0,25% p/p, más preferiblemente de 0,05 a 0,2% p/p, lo más preferiblemente de 0,06 a 0,1% p/p (excluido el peso de las moléculas de agua) al medio de cultivo.

Se puede añadir $MgSO_4$ y/o $CaSO_4$ junto con Na_2SO_4 al mismo tiempo. En ese caso, el contenido de Na_2SO_4 es preferiblemente como máximo 0,1% p/p en el medio de cultivo, y más preferiblemente no se añade Na_2SO_4. Además, se pueden añadir $MgSO_4$ y $CaSO_4$ como sulfatos metálicos, por ejemplo, en una cantidad de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ al 0,05% p/p + $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ al 0,05% p/p, o $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ al 0,06% p/p + $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ al 0,06% p/p en el medio de cultivo.

El sulfato metálico se puede añadir al medio de cultivo antes o durante el cultivo principal. A diferencia de los ácidos orgánicos, el sulfato metálico se añade preferiblemente en un momento anterior al comienzo del cultivo principal debido a una baja posibilidad de reacción con las fuentes de carbono tales como la glucosa durante la esterilización y para facilitar el procedimiento.

Las etapas (a) a (c) se pueden llevar a cabo individualmente o combinadas. Por ejemplo, las etapas (a) y (b) se deben llevar a cabo combinadas preferiblemente el mismo día, más preferiblemente al mismo tiempo debido a una variación potencial en el pH durante la etapa (a) y para facilitar el procedimiento. Para una mayor facilidad del procedimiento, estas etapas no se deben llevar a cabo en el momento en que se añaden las fuentes de carbono tales como la glucosa, y preferiblemente se deben llevar a cabo en días diferentes a los de la adición de las fuentes de carbono.

Además, por ejemplo, son posibles combinaciones de las etapas (a) y (b), las etapas (a) y (c), y las etapas (a), (b) y (c). En estos casos, preferiblemente la etapa (c) se lleva a cabo antes del comienzo del cultivo principal, y las etapas (a) y/o (b) se llevan a cabo después del comienzo del cultivo principal y un día diferente al de la adición de las fuentes de carbono para facilitar el procedimiento.

El método proporciona una célula microbiana con alto contenido de PUFA o lípidos que contienen un PUFA, se prefiere particularmente la combinación de todas las etapas (a), (b) y (c).

El procedimiento de cultivo mencionado anteriormente puede conducir a la producción y acumulación de un lípido que contiene los PUFA ARA y/o DGLA en las células de los microorganismos.

Los ejemplos de los lípidos contenidos en una célula microbiana incluyen triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos, fosfolípidos, lisofosfolípidos, glicófosfolípidos y ácidos grasos libres. En particular, las células microbianas mencionadas anteriormente producen triglicéridos como lípido principal.

Los ácidos grasos que constituyen el lípido incluyen PUFA. Los PUFA incluyen ácido dihomo-gamma-linolénico (DGLA), ácido araquidónico (ARA). En el método de la presente invención, se utilizan *Mortierella alpina* capaces de producir ARA y DGLA. Por consiguiente, los PUFA particularmente preferidos son ARA y DGLA, y DGLA es el más preferido.

La célula microbiana comprende un alto contenido de PUFA o un lípido que contiene PUFA. Cuando el PUFA es DGLA, el contenido de DGLA o el residuo de DGLA después del final del cultivo de los microorganismos sin adición de DGLA al medio de cultivo es de más de 164 mg, por ejemplo, 190 mg o más, preferiblemente 195 mg o más, más preferiblemente 200 mg o más, lo más preferiblemente 220 mg o más (en términos del ácido graso libre) en 1 g de células secas tal como se mide por la técnica descrita, por ejemplo, en los Ejemplos a continuación. En una realización, el contenido de DGLA resultante en 1 g de células secas se puede aumentar de acuerdo con un método de la presente invención, por ejemplo, 3% o más, preferiblemente 5% o más, más preferiblemente 10% o más (en términos del ácido graso libre) en comparación con un método convencional (sin incluir las etapas (a) a (c)). Además, el contenido del ARA resultante en 1 g de células secas se puede aumentar según un método de la presente invención en comparación con un método convencional (sin incluir las etapas (a) a (c)).

De manera similar, la productividad por unidad de volumen del medio de cultivo de un PUFA que constituye un lípido contenido en las células microbianas es deseablemente alta. Cuando el PUFA es DGLA, el rendimiento del DGLA o el residuo de DGLA para 1 mL del medio de cultivo después del final del cultivo de los microorganismos sin adición de DGLA al medio de cultivo es de 5,5 mg o más, preferiblemente 6,5 mg o más, más preferiblemente 7,0 mg o más, lo más preferiblemente 7,5 mg o más (en términos de ácido graso libre), medido por la técnica descrita, por ejemplo, en los Ejemplos a continuación. En una realización, el contenido del DGLA resultante en 1 mL del medio de cultivo después del final del cultivo se puede aumentar en un método de la presente invención, por ejemplo, 5% o más, preferiblemente 10% o más, más preferiblemente 15% o más (en términos de ácido graso libre) en comparación con un método convencional (sin incluir las etapas (a) a (c)). Además, el contenido del ARA resultante en 1 mL del medio de cultivo después del final del cultivo se puede aumentar en un método de la presente invención en comparación con un método convencional (sin incluir las etapas (a) a (c)).

En una realización, el contenido de DGLA en el ácido graso total es preferiblemente alto en un PUFA o un lípido que contiene un PUFA obtenido por el método de la presente invención, y es, por ejemplo, 35% p/p o más, preferiblemente 37% p/p o más, lo más preferiblemente 40% p/p o más (en términos de ácido graso libre) medido por la técnica descrita, por ejemplo, en los Ejemplos a continuación.

Después del final del cultivo, se pueden recuperar del medio de cultivo un PUFA, un lípido que contiene un PUFA y células microbianas que contienen uno de estos mediante cualquier mecanismo conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo, mediante el mecanismo descrito en el documento JP-A-2000-69987 o en los Ejemplos a continuación. El PUFA resultante o un lípido que contiene un PUFA se describieron anteriormente.

La célula se esteriliza opcionalmente y a continuación se seca preferiblemente. La etapa de secado para obtener la célula microbiana seca puede ser, por ejemplo, calentamiento en horno, liofilización y secado con aire caliente. Para las células microbianas obtenidas del medio de cultivo después del final del cultivo, el peso seco de las células por unidad de volumen del medio de cultivo es deseablemente alto, y, por ejemplo, el peso seco de las células para 1 mL del medio de cultivo es preferiblemente aproximadamente 34 mg o más.

Un lípido que contiene un PUFA se puede recuperar de una célula seca o una célula húmeda utilizando cualquier mecanismo conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se extrae una célula seca con un disolvente orgánico tal como hexano, y a continuación se separa mediante destilación el disolvente orgánico del extracto a presión reducida para producir un lípido, compuesto principalmente de triglicéridos, que contiene una alta concentración de PUFA. Además, el lípido resultante, compuesto principalmente por triglicéridos, se purifica mediante procedimientos ordinarios para grasas y aceites comestibles, tales como desgomado, desoxidación, decoloración y desodorización para producir grasas y aceites comestibles de alta pureza (triglicéridos).

Aunque el PUFA en un lípido se puede aislar directamente, se puede aislar fácilmente en forma de éster con un alcohol inferior tal como el éster metílico de los otros componentes lipídicos, y solo un PUFA deseado se puede aislar fácilmente de los otros PUFA. Dichos mecanismos de aislamiento son conocidos por los expertos en la técnica.

La célula microbiana se puede utilizar tal cual o en estado seco. Además, también se pueden utilizar en diversas aplicaciones un PUFA y un lípido que contiene un PUFA producido por un método de la presente invención. Estos se pueden añadir, por ejemplo, a alimentos y bebidas, incluidos suplementos dietéticos, composiciones nutricionales, forrajes para animales (en particular, alimentos para mascotas), alimentos de acuicultura para peces y mariscos, y leche en polvo utilizando los mecanismos conocidos por los expertos en la técnica según la descripción, por ejemplo, del Ejemplo a continuación. La ingesta preferida de PUFA, en particular, ARA y DGLA se describe, por ejemplo, en la Bibliografía No Relacionada con Patentes 1.

Como se mencionó anteriormente, los alimentos y bebidas anteriores con alto contenido de PUFA, en particular, DGLA se pueden preparar fácilmente utilizando *Mortierella alpina* incluso si se emplea un bajo contenido de células microbianas. Por ejemplo, se puede obtener un alimento para mascotas que contenga aproximadamente al menos 100 mg de DGLA en 100 g de alimento para mascotas añadiendo 0,5% p/p de células microbianas secas. Además, el triglicérido extraído de las células microbianas mencionadas anteriormente y purificado tiene un contenido de DGLA muy alto en los ácidos grasos totales, y es adecuado para grasas y aceites comestibles.

Se permite que las aplicaciones específicas (por ejemplo, suplementos nutritivos, promoción del crecimiento, promoción de la salud, suministro de ácidos grasos específicos (por ejemplo, DGLA y ARA) y mejora de la función cerebral) y/o los usos específicos (por ejemplo, cantidades, tiempos, y periodos) estén indicados para las células microbianas (secas) mencionadas anteriormente, un PUFA o un lípido que contiene un PUFA, o alimentos y bebidas que contienen uno de estos.

Ejemplos

La presente invención se describirá en detalle a continuación mediante Ejemplos no limitantes. Téngase en cuenta que Mortierella alpina 1S-4 produce un lípido que contiene ARA en los Ejemplos. Mortierella alpina S14 es una cepa mutante inducida a partir de Mortierella alpina1S-4 por los autores de la presente invención, en la que la casi se ha perdido la actividad Δ5-desaturasa para convertir DGLA, que es un precursor directo de ARA, en ARA. Es decir, la cepa no produce sustancialmente ARA, pero produce un lípido con un alto contenido de DGLA (véase la Bibliografía No Relacionada con Patentes 1). Mortierella alpina Iz3 tampoco produce ARA sustancialmente, pero produce un lípido con un alto contenido de DGLA, como S14.

Ejemplo 1: Efecto de la adición de ácido orgánico a cultivo en tubo de ensayo

Se inoculó aproximadamente un asa de siembra de platino de Mortierella alpina S14 en 10 mL de medio de cultivo líquido que contenía polvo de soja (glucosa al 3% p/p, polvo de soja al 1,5% p/p, K_2HPO_4 al 0,3% p/p, Na_2SO_4 al 0,1% p/p, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ al 0,05% p/p y $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ al 0,05% p/p, pH 6,3) en un tubo de ensayo, y se cultivó con movimiento oscilante a 28°C durante tres días. A los cuatro días después del comienzo del cultivo, se añadió una solución de glucosa esterilizada al 50% p/p a 0,6 mL del medio de cultivo, al que también se añadieron 0,6 mL de solución acuosa de ácido orgánico que tenía una concentración de 5% p/v después del ajuste del pH a 6,0 con NaOH para el cultivo adicional (cultivo con movimiento oscilante). La concentración del ácido orgánico en el volumen total del medio de cultivo fue de aproximadamente 0,3% p/v. Se utilizaron los siguientes ácidos orgánicos: ácido succínico, ácido fumárico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido cítrico, ácido tartárico y ácido acético. El medio de cultivo de control se preparó por el mismo procedimiento, excepto que no se añadió solución de ácido orgánico.

El cultivo se terminó en diez días después de la inoculación, y la célula seca resultante se esterificó con metilo

mediante la técnica descrita en el documento JP-A-2000-69987. El éster metílico de ácido graso resultante se analizó por cromatografía de gases. Específicamente, la célula cultivada se obtuvo a partir de la solución de cultivo mediante filtración después de la finalización del cultivo, y se lavó a fondo y a continuación se secó por calentamiento en horno (100ºC) para producir una célula seca. La célula seca resultante se colocó en un tubo de ensayo con tapón de rosca (16,5 mm de diámetro), al que se añadieron 1 mL de cloruro de metileno y 2 mL de metanol anhidro-ácido clorhídrico (10%). El residuo de ácido graso en la célula se esterificó con metilo por tratamiento a 50ºC durante 3 horas, a lo que se añadieron 4 mL de n-hexano y 1 mL de agua. La mezcla se extrajo dos veces y el disolvente del extracto se destiló mediante un evaporador centrífugo (40°C, una hora) para producir un éster metílico de ácido graso. El éster metílico de ácido graso resultante se analizó por cromatografía de gases capilar para la determinación del contenido de DGLA. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

Ácido orgánico (0,3% p/v)	Peso seco de células (mg/mL de medio de cultivo)	Contenido de DGLA por peso seco de células (mg/g de célula seca)	Contenido de DGLA por unidad de volumen de medio de cultivo (mg/mL de medio de cultivo)
Ninguno	32,9	164	5,39
Ácido succínico	33,7	187	6,28
Ácido fumárico	33,0	182	6,01
Ácido pirúvico	33,4	179	5,97
Ácido láctico	34,8	166	5,77
Ácido cítrico	31,6	162	5,12
Ácido tartárico	28,9	139	4,03
Ácido acético	12,1	81	0,98

El peso seco de células por unidad de volumen del medio de cultivo, el contenido de DGLA por peso seco de células y el contenido de DGLA por unidad de volumen del medio de cultivo se incrementaron mediante la adición de ácido succínico, ácido fumárico, ácido pirúvico y ácido láctico, pero no se incrementaron mediante la adición de ácido cítrico, ácido tartárico y ácido acético.

Ejemplo 2: Efecto de la adición de ácido orgánico en cultivo en matraz

Se inoculó aproximadamente un asa de siembra de platino de Mortierella alpina S14 en 100 mL de medio de cultivo líquido que contenía extracto de levadura (glucosa al 8% p/p, extracto de levadura al 1,5% p/p, K_2HPO_4 al 0,3% p/p, Na_2SO_4 al 0,1% p/p, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ al 0,05% p/p y $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ al 0,05% p/p, pH 6,3) en un matraz, y se cultivó con movimiento oscilante a 28ºC durante cinco días. A los seis días del comienzo del cultivo, se añadieron 2 mL de solución de ácido láctico al 10% p/v después del ajuste del pH a 6,0 utilizando NaOH para el cultivo adicional (cultivo con movimiento oscilante). La concentración del ácido láctico basada en el volumen total del medio de cultivo fue de aproximadamente 0,2% p/v. El cultivo se terminó a los diez días de la inoculación. Se obtuvo una célula seca como en el Ejemplo 1, y se midió el contenido de DGLA. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Ácido láctico	No añadido	Añadido
Peso seco de células (mg/mL de medio de cultivo)	13,8	14,9
Contenido de DGLA por peso seco de células (mg/g de célula seca)	75,3	98,4
Contenido de DGLA por unidad de volumen de medio de cultivo (mg/mL de medio de cultivo)	1,04	1,47
Porcentaje de DGLA en ácidos grasos totales (%)	33,5	34,7

La adición de ácido láctico condujo a un aumento en el peso seco de las células por unidad de volumen del medio de cultivo, el contenido de DGLA por peso seco de las células y el contenido de DGLA por unidad de volumen del medio de cultivo. Además, aumentó el porcentaje de DGLA en los ácidos grasos totales contenidos en el lípido resultante.

Ejemplo 3: Efecto de la adición de ácido orgánico en cultivo en fermentador de jarra

Se inoculó un asa de siembra de platino de Mortierella alpina S14 en 100 mL de medio de cultivo de siembra (glucosa al 2% p/p y extracto de levadura al 1% p/p, pH 6,3), y se precultivó durante tres días con movimiento

oscilante recíproco a 100 rpm a 28ºC para preparar una solución de cultivo de siembra. A continuación, se introdujeron 5 L del medio de cultivo principal (glucosa al 2% p/p, polvo de soja al 1,5% p/p, glicerol al 0,1% p/p, aceite de soja al 0,2% p/p, K_2HPO_4 al 0,3% p/p Na_2SO_4 al 0,1% p/p, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ al 0,05% p/p y $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ al 0,05% p/p, pH 6,3) en un recipiente de cultivo con agitación centrífuga con aireación de 10 L y la mezcla se esterilizó. Después de añadir toda la solución de cultivo de siembra al recipiente, se llevó a cabo un cultivo con agitación centrífuga con aireación (cultivo principal) a 26°C durante siete días a una velocidad de aireación de 1 vvm (aire, que también se utilizó en los Ejemplos a continuación) y una velocidad de agitación de 300 rpm. La glucosa se suministraba de forma continua si era necesario en respuesta al consumo de glucosa, de modo que la glucosa siempre estuviera presente en el medio de cultivo. A los cuatro días del comienzo del cultivo principal, que fue alrededor del momento después de la fase de crecimiento logarítmico y el comienzo de la fase de acumulación de ácidos grasos, se añadió una solución de ácido orgánico (ácido succínico, ácido fumárico o ácido láctico) después del ajuste del pH a 6,3 por medio de NaOH de tal manera que la concentración final fuera de 0,3% p/v. A partir de ese momento, se continuó con el cultivo con agitación centrífuga con aireación. A los siete días del comienzo del cultivo principal, se obtuvo una célula seca como en el Ejemplo 1 para la determinación del contenido de DGLA. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

Ácido orgánico (0,3% p/v)	Ninguno	Ácido succínico	Ácido fumárico	Ácido láctico
Peso seco de células (mg/mL de medio de cultivo)	29,6	29,4	29,6	30,5
Contenido de DGLA por peso seco de células (mg/g de células secas)	199	222	223	203
Contenido de DGLA por unidad de volumen de medio de cultivo (mg/mL de medio de cultivo)	5,88	6,54	6,58	6,21
Porcentaje de DGLA en ácidos grasos totales (%)	37,2	40,1	38,2	37,8

La adición de ácido succínico, ácido fumárico o ácido láctico condujo a un aumento en el contenido de DGLA por peso seco de células y el contenido de DGLA por unidad de volumen del medio de cultivo. Además, aumentó el porcentaje de DGLA en los ácidos grasos totales contenidos en el lípido resultante. En particular, el aumento debido a la adición de ácido succínico o ácido fumárico fue notable.

Ejemplo 4: Efecto del control del pH después de la inoculación I

Se inoculó aproximadamente un asa de siembra de platino de Mortierella alpina S14 en 100 mL de medio de cultivo de siembra (glucosa al 2% y extracto de levadura al 1%, pH 6,3) y se precultivó durante tres días con movimiento oscilante recíproca a 100 rpm a 28°C para preparar una solución de cultivo de siembra. A continuación, se introdujeron 5 L del medio de cultivo principal (glucosa al 2% p/p, polvo de soja al 1,5% p/p, glicerol al 0,02% p/p, aceite de soja al 0,2% p/p, K_2HPO_4 al 0,3% p/p, Na_2SO_4 al 0,1% p/p, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ al 0,5% p/p y $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ al 0,5% p/p, pH 6,3) en un recipiente de cultivo con agitación centrífuga con aireación de 10 L y la mezcla se esterilizó. Después de que se añadiera toda la solución de cultivo de siembra al recipiente, se llevó a cabo un cultivo de con agitación centrífuga con aireación (cultivo principal) a 26ºC durante trece días a una velocidad de aireación de 1 vvm y una velocidad de agitación de 300 rpm. La glucosa se suministró de forma continua si fuera necesario en respuesta al consumo de glucosa, de modo que la glucosa siempre estuviera presente en el medio de cultivo. El pH se ajustó a 5,0, 5,8, o 7,2 con una solución de NaOH esterilizada o ácido sulfúrico cinco días después del cultivo principal hasta el final del cultivo, que fue alrededor del momento después de la fase de crecimiento logarítmico y el comienzo de la fase de acumulación de ácido graso. Téngase en cuenta que el pH del grupo de control sin ajuste de pH cinco días después del comienzo del cultivo principal fue de aproximadamente 6,3. A los trece días del comienzo del cultivo principal, se obtuvo una célula seca como en el Ejemplo 1, y se midió el contenido de DGLA. Los resultados se muestran en las Fig. 1A a 1C, en donde el eje horizontal representa el valor de pH el quinto día del cultivo.

Un pH más bajo (más bajo que el pH de 6,3 del grupo de control) controlado el quinto día del cultivo condujo a una baja productividad de DGLA del microorganismo, mientras que un pH más alto (más alto que el pH de 6,3 del grupo de control) condujo a una alta productividad de DGLA del microorganismo.

Ejemplo 5: Efecto del control del pH después de la inoculación II

Se cultivó Mortierella alpina S14 como en el Ejemplo 4 (precultivo durante tres días y cultivo principal durante once días). La glucosa se suministró de forma continua si era necesario en respuesta al consumo de glucosa, de modo que la glucosa siempre estuviera presente en el medio de cultivo. En tres días desde el comienzo del cultivo principal hasta el final del cultivo, que fue alrededor del momento después de la fase de crecimiento logarítmico y el

comienzo de la fase de acumulación de ácidos grasos, el pH se ajustó a 6,6, 6,9, 7,2 o 7,5 con una solución de NaOH esterilizada o ácido sulfúrico. A los once días del comienzo del cultivo principal, se obtuvo una célula seca como en el Ejemplo 1, y se midió el contenido de DGLA. Los resultados se muestran en las Fig. 2A a 2C, en donde el eje horizontal representa el valor de pH el tercer día del cultivo.

El pH se controló el tercer día del cultivo. El pH ajustado a 6,9 o 7,2 condujo a un aumento en la productividad de DGLA del microorganismo en comparación con un caso de pH ajustado a 6,6 o 7,5. Además, el control del pH tres y cinco días después del comienzo del cultivo principal condujo a un aumento en la productividad de DGLA. Por lo tanto, el pH se pudo controlar alrededor de ese momento después del comienzo del cultivo principal y conveniente para el funcionamiento del cultivo.

Ejemplo 6: Efecto del control del pH después de la inoculación III

Se cultivó Mortierella alpina 1S-4 como en el Ejemplo 4 (precultivo durante tres días y cultivo principal durante siete días). La glucosa se suministró de forma continua si era necesario en respuesta al consumo de glucosa, de modo que la glucosa siempre estuviera presente en el medio de cultivo. Cuatro días después del comienzo del cultivo principal, el pH del medio de cultivo se ajustó de 6,6 a 6,8 con una solución de NaOH esterilizada. Posteriormente, el pH no se controló particularmente. Siete días después del comienzo del cultivo principal, se obtuvo una célula seca como en el Ejemplo 1, y se midió el contenido de ARA. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4

Control de pH	No controlado	6,6→6,8
Peso seco de las células (mg/mL de medio de cultivo)	40,0	34,3
Contenido de ARA por peso seco de células (mg/g de células secas)	140	206
Contenido de ARA por unidad de volumen de medio de cultivo (mg/mL de medio de cultivo)	5,30	7,07
Porcentaje de ARA en ácidos grasos totales (%)	31,1	37,9

El pH controlado el cuarto día del cultivo condujo a un aumento en la productividad de ARA del microorganismo en comparación con el caso con el pH no controlado.

Ejemplo 7: Método para añadir ácidos orgánicos

Se cultivó Mortierella alpina S14 como en el Ejemplo 4 (precultivo durante tres días y cultivo principal durante diez días). La glucosa se suministró de forma continua si era necesario en respuesta al consumo de glucosa, de modo que la glucosa siempre estuviera presente en el medio de cultivo. A los cuatro días, o a los cuatro y siete días después del comienzo del cultivo principal, se añadió una solución de sal sódica de ácido succínico o ácido láctico de tal manera que las concentraciones finales fueron las indicadas en la Tabla 5. Téngase en cuenta que los valores de pH de los medios de cultivo de A a D en la Tabla 5 se ajustaron a aproximadamente 6,9 con una solución de NaOH el cuarto día del cultivo principal. Diez días después del comienzo del cultivo principal, se obtuvo una célula seca como en el Ejemplo 1, y se midió el contenido de DGLA. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

Ácido orgánico que se va a añadir (% p/v de medio de cultivo)			Control	A	B	C	D
	Ácido succínico	4º día	0	0,22	0,22	0,22	0,44
		7º día	0	0	0,22	0	0
	Ácido láctico	7º día	0	0	0	0,22	0
Peso seco de células (mg/mL de medio de cultivo)			34,6	36,8	36,6	36,9	39,1
Contenido de DGLA por peso seco de células (mg/g de células secas)			220	227	243	228	241
Contenido de DGLA por unidad de volumen de medio de cultivo (mg/mL de medio de cultivo)			7,60	8,33	8,90	8,40	9,41
Porcentaje de DGLA en ácidos grasos totales (%)			40,9	40,8	43,0	41,2	42,2

La adición de ácido succínico o ácido láctico a una concentración final de 0,22% p/v o 0,44% p/v el cuarto o séptimo días del cultivo principal condujo a un aumento en el contenido de DGLA por peso seco de células y el contenido de DGLA por unidad de volumen del medio de cultivo. La adición combinada de ácido succínico y ácido láctico también fue eficaz.

Ejemplo 8: Cantidad de ácido succínico que se debe añadir

Se inoculó aproximadamente un asa de siembre de platino de Mortierella alpina S14 en 100 mL de medio de cultivo de siembra (glucosa al 2% p/p y extracto de levadura al 1% p/p, pH 6,3) y se precultivó durante tres días con movimiento oscilante recíproco a 100 rpm a 28°C para preparar una solución de cultivo de siembra. A continuación, se introdujeron 5 L del medio de cultivo principal (glucosa al 2% p/p, polvo de soja al 1,5% p/p, glicerol al 0.02% p/p, aceite de soja al 0,1% p/p, K_2HPO_4 al 0,3% p/p, Na_2SO_4 al 0,1% p/p, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ al 0,5% p/p y $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ al 0,5% p/p, pH 6,3) en un recipiente de cultivo con agitación centrífuga con aireación de 10 L y la mezcla se esterilizó. Después de que se añadiera toda la solución de cultivo de siembra al recipiente, se llevó a cabo un cultivo con agitación centrífuga con aireación (cultivo principal) a 26°C durante once días a una velocidad de aireación de 1 vvm y una velocidad de agitación de 300 rpm. La glucosa se suministró de forma continua si era necesario en respuesta al consumo de glucosa, de modo que la glucosa siempre estuviera presente en el medio de cultivo. A los cuatro días del comienzo del cultivo principal, se añadió una solución de sal sódica de ácido succínico de modo que la concentración final fuera 0,44, 0,87 o 1,3% p/v. Téngase en cuenta que el pH del medio de cultivo se ajustó a aproximadamente 6,9 con una solución de NaOH a los cuatro días del comienzo del cultivo principal en todos los casos. Once días después del comienzo del cultivo principal, se obtuvo una célula seca como en el Ejemplo 1, y se midió el contenido de DGLA. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6

Ácido succínico que se debe añadir	0,44% p/v	0,87% p/v	1,3% p/v
Peso seco de células (mg/mL de medio de cultivo)	37,3	37,6	37,2
Contenido de DGLA por peso seco de células (mg/g de células secas)	225	228	211
Contenido de DGLA por unidad de volumen de medio de cultivo (mg/mL de medio de cultivo)	8,39	8,57	7,87
Porcentaje de DGLA en ácidos grasos totales (%)	40,0	40,4	39,2

La adición de ácido succínico con una concentración de 0,87% p/v o 1,3% p/v condujo a una productividad equivalente a la del caso de una concentración de 0,44% p/v. Esto aclara que el contenido de DGLA no necesariamente aumenta en respuesta a un aumento en la cantidad de ácido orgánico que se va a añadir que excede un cierto nivel, de modo que el ácido orgánico se puede añadir en una cantidad que excede un cierto nivel.

Ejemplo 9: Efecto del ácido málico

Se cultivo Mortierella alpina S14 como en el Ejemplo 8 (precultivo durante tres días y cultivo principal durante ocho días). La glucosa se suministró de forma continua si era necesario en respuesta al consumo de glucosa, de modo que la glucosa siempre estuviera presente en el medio de cultivo. A los cuatro días del comienzo del cultivo principal, se añadió una solución de sal sódica de ácido málico de modo que la concentración final fuera de 0,71% p/v. Téngase en cuenta que, el pH del medio de cultivo se ajustó a aproximadamente 6,9 con una solución de NaOH a los cuatro días del comienzo del cultivo principal en todos los casos. Ocho días después del comienzo del cultivo principal, se obtuvo una célula seca como en el Ejemplo 1, y se midió el contenido de DGLA. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7

Ácido málico que se debe añadir	Ninguno	0,71% p/v
Peso seco de células (mg/mL de medio de cultivo)	34,0	36,3
Contenido de DGLA por peso seco de células (mg/g de células secas)	197	207
Contenido de DGLA por unidad de volumen de medio de cultivo (mg/mL de medio de cultivo)	6,71	7,53
Porcentaje de DGLA en ácidos grasos totales (%)	39,4	38,7

La adición de ácido málico condujo a la producción de células microbianas con alto contenido de DGLA.

Ejemplo 10: Efecto del ácido succínico en la producción de DGLA a partir de otras cepas

Se inoculó aproximadamente un asa siembra de platino de Mortierella alpina Iz3 en 100 mL de medio de cultivo de siembra (glucosa al 2% p/p y extracto de levadura al 1% p/p, pH 6,3) y se precultivó durante tres días con movimiento oscilante recíproco a 100 rpm a 28°C para preparar una solución de cultivo de siembra. Se preparó Mortierella alpina Iz3, una cepa que puede producir DGLA, mediante tratamiento con nitrosoguanidina (una

operación de mutación ordinaria) de Mortierella alpina IS-4 que puede producir ARA por el mismo procedimiento para Mortierella alpina S14. A continuación, se introdujeron 5 L del medio de cultivo principal (glucosa al 2% p/p, polvo de soja al 1,5% p/p, glicerol al 0,02% p/p, aceite de soja al 0,2% p/p de, K_2HPO_4 al 0,3% p/p, Na_2SO_4 al 0,1% p/p, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ al 0,5% p/p y $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ al 0,5% p/p, pH 6,3) en un recipiente de cultivo con agitación centrífuga con aireación de 10 L y la mezcla se esterilizó. Después de que se añadiera toda la solución de cultivo de siembra al recipiente, se llevó a cabo un cultivo con agitación centrífuga con aireación (cultivo principal) a 26°C durante nueve días a una velocidad de aireación de 1 vvm y una velocidad de agitación de 300 rpm. La glucosa se suministró de forma continua si era necesario en respuesta al consumo de glucosa, de modo que la glucosa siempre estuviera presente en el medio de cultivo. A los cuatro días del comienzo del cultivo principal, se añadió una solución de sal sódica de ácido succínico de modo que la concentración final fuera de 0,44% p/v. Téngase en cuenta que, el pH del medio de cultivo se ajustó a aproximadamente 6,9 con una solución de NaOH cuatro días después del comienzo del cultivo principal en todos los casos. Nueve días después del comienzo del cultivo principal, se obtuvo una célula seca como en el Ejemplo 1, y se midió el contenido de DGLA. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8

Ácido succínico que se debe añadir	Ninguno	0,44% p/v
Peso seco de células (mg/mL de medio de cultivo)	31,8	34,7
Contenido de DGLA por peso seco de células (mg/mL de células secas)	160	186
Contenido de DGLA por unidad de volumen de medio de cultivo (mg/mL de medio de cultivo)	5,08	6,46
Porcentaje de DGLA en ácidos grasos totales (%)	34,1	36,6

La adición de ácido succínico condujo a un aumento en la productividad de DGLA a partir de Mortierella alpina Iz3, como Mortierella alpina S14.

Ejemplo comparativo 1: Cultivo de DGLA en un recipiente de cultivo de 10 kL

Se utilizó Mortierella alpina S14. Se inoculó aproximadamente un asa de siembra de platino de la cepa microbiana de partida en un medio de cultivo (pH 6,3) compuesto por extracto de levadura al 1% p/p y glucosa al 2% p/p para iniciar el precultivo con movimiento oscilante recíproco a 100 rpm a 28°C durante tres días (la primera fase). A continuación, se prepararon 30 L de medio de cultivo (pH 6,3) compuesto por extracto de levadura al 1% p/p, glucosa al 2% p/p y aceite de soja al 0,1% p/p en un recipiente de cultivo de 50 L, en el que se inoculó solución de cultivo de siembra (la primera fase) para iniciar el precultivo durante dos días (la segunda fase). Después, se inoculó una solución de cultivo de siembra en el medio de cultivo principal (glucosa al 2% p/p, polvo de soja al 3,1% p/p, glicerol al 0,02% p/p, K_2HPO_4 al 0,3% p/p, Na_2SO_4 al 0,1% p/p, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ al 0,5% p/p, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ al 0,5% p/p, aceite de soja al 0,1% p/p y Adekanate al 0,01% p/p, pH 6,3) (la segunda fase), y los medios de cultivo resultantes se combinaron con 6000 L en total de la solución de cultivo inicial (volumen del recipiente de cultivo: 10 kL) para iniciar el cultivo a 26°C bajo una presión interna de 200 kPa. El cultivo se llevó a cabo durante doce días mientras se suministraba glucosa continuamente del primer al quinto día del cultivo en respuesta al consumo de glucosa, de modo que la glucosa siempre estuviera presente en el medio de cultivo. El pH no fue controlado. El pH varió entre 6,0 y 6,5, disminuyó una vez durante la fase de crecimiento logarítmico, después regresó gradualmente al nivel original y varió ligeramente durante la fase de acumulación de ácidos grasos, como una tendencia general.

Después del final del cultivo, se esterilizaron 7,9 kL de la solución de cultivo a 121°C durante 20 minutos. A continuación, se recogió una célula microbiana húmeda utilizando una prensa de filtro horizontal que tenía un mecanismo de prensa neumática, y se secó con aire caliente a 100ºC para producir células microbianas secas (contenido de humedad: 2%). El peso de las células microbianas secas resultantes por unidad de volumen del medio de cultivo fue de 47,2 kg/kL, el contenido de DGLA por peso seco de células microbianas fue de 174 g/kg, el contenido de DGLA por unidad de volumen del medio de cultivo fue de 8,18 kg/kL, y el porcentaje de DGLA en los ácidos grasos totales fue de 39,1%. Además, se añadió hexano a la célula microbiana seca para la extracción con movimiento oscilante suave a temperatura ambiente. La solución en hexano resultante se filtró a través de un papel de filtro para eliminar el contenido de sólido, y el producto filtrado se calentó de aproximadamente 30 a 40ºC a presión reducida para eliminar el hexano, dando como resultado triglicéridos de ácidos grasos que contenían DGLA. El porcentaje de DGLA en los ácidos grasos totales en los triglicéridos fue de 38,5%.

Ejemplo 11: Cultivo de DGLA en recipiente de cultivo de 10 kL

El cultivo de Mortierella alpina S14 se inició con 6000 L en total de la solución de cultivo principal inicial como en el Ejemplo Comparativo 1. El cultivo continuó durante doce días mientras se suministraba glucosa continuamente los días primero a tercero y sexto del cultivo principal de modo que la glucosa siempre estuvo presente en el medio de cultivo. El cuarto día de cultivo principal, se añadieron solución de succinato disódico hexahidratado al 1% p/v (60 kg, ácido succínico a aproximadamente 0,44% p/v) y NaOH (1,26 kg) para ajustar el pH a 6,9. Posteriormente, el pH

del medio de cultivo se mantuvo entre 6,9 y 7 hasta el final del cultivo.

Después del final del cultivo, se obtuvieron una célula microbiana seca y triglicéridos de ácidos grasos que contenían DGLA como en el Ejemplo Comparativo 1. El peso de la célula microbiana seca resultante por volumen del medio de cultivo fue de 51,8 kg/kL, el contenido de DGLA por peso seco de célula microbiana fue de 240 g/kg, y el contenido de DGLA por unidad de volumen del medio de cultivo fue de 12,43 kg/kL. Además, el porcentaje de DGLA en los ácidos grasos totales en los glicéridos resultantes fue de 45,8%.

Las cantidades de las células microbianas secas y el contenido de DGLA obtenido en el Ejemplo Comparativo 1 y el Ejemplo 11 se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9

	Ejemplo Comparativo 1	Ejemplo 11
Peso seco de células (kg/kL de medio de cultivo)	47,2	51,8
Contenido de DGLA por peso seco de célula (g/kg de célula)	174	240
Contenido de DGLA por unidad de volumen de medio de cultivo (kg/kL de medio de cultivo)	8,18	12,43
Porcentaje de DGLA en ácidos grasos totales (%)	38,5	45,8

Ejemplo 12: Efecto de las sales sulfato en el cultivo en fermentador de jarra

Se inoculó aproximadamente un asa de siembra de platino de Mortierella alpina S14 en 100 mL de medio de cultivo de siembra (glucosa al 2% p/p y extracto de levadura al 1% p/p, pH 6,3) y se precultivó durante tres días con movimiento oscilante recíproco a 100 rpm a 28°C. A continuación, se introdujeron 5 L del medio de cultivo principal en un recipiente de cultivo con agitación centrífuga con aireación de 10 L y la mezcla se esterilizó. Después de que toda la solución de cultivo de siembra se inoculara en el recipiente, se llevó a cabo el cultivo a 26°C durante once días a una velocidad de aireación de 1 vvm y una velocidad de agitación de 300 rpm. Los principales medios de cultivo, respectivamente, tenían las siguientes tres composiciones:

(i) Sal cloruro y sulfato de sodio (control):
glucosa al 2% p/p, soja en polvo al 1,5 p/p, glicerol al 0,02 p/p, aceite de soja al 0,2 p/p, K_2HPO_4 al 0,3% p/p, Na_2SO_4 al 0,1% p/p, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ al 0,5% p/p y $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ al 0,5% p/p, pH 6,3

(ii) Sal sulfato y sulfato de sodio:
glucosa al 2% p/p, soja en polvo al 1,5% p/p, glicerol al 0,02% p/p, aceite de soja al 0,2% p/p, K_2HPO_4 al 0,3% p/p, Na_2SO_4 al 0,1% p/p, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ al 0,5% p/p, y $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ al 0,5% p/p, pH 6,3

(iii) Sal sulfato, libre de sulfato de sodio:
glucosa al 2% p/p, soja en polvo al 1,5% p/p, glicerol al 0,02% p/p, aceite de soja al 0,2% p/p, K_2HPO_4 al 0,3% p/p, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ al 0,5% p/p y $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ al 0,5% p/p, pH 6,3

La glucosa se suministró de forma continua si era necesario en respuesta al consumo de glucosa, de modo que la glucosa siempre estuviera presente en el medio de cultivo. Cuatro días después del comienzo del cultivo principal, se añadió una solución de sal sódica de ácido succínico de modo que la concentración final fuera de 0,44% p/v. Téngase en cuenta que, el pH del medio de cultivo se ajustó a aproximadamente 6,9 con una solución de NaOH cuatro días después del comienzo del cultivo principal en todos los casos. Once días después del comienzo del cultivo principal, se obtuvo una célula seca como en el Ejemplo 1 para la determinación del contenido de DGLA. Los resultados se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10

Medios de cultivo	(i) Sal cloruro (control)	(ii) Sal sulfato y sulfato de sodio	(iii) Sal sulfato, libre de sulfato de sodio
Peso seco de células (mg/mL de medio de cultivo)	36,7	37,7	37,0
Contenido de DGLA por peso seco de células (mg/g de células secas)	206	232	267
Contenido de DGLA por unidad de volumen de medio de cultivo (mg/mL de medio de cultivo)	7,6	8,7	9,9
Porcentaje de DGLA en ácidos grasos totales (%)	37,5	38,2	44,0

El uso del medio de cultivo de "sal sulfato y sulfato de sodio" condujo a un aumento tanto en el contenido de DGLA por peso seco de células microbianas como en el contenido de DGLA por unidad de volumen del medio de cultivo en comparación con el medio de cultivo de control. También aumentó el porcentaje de DGLA en los ácidos grasos totales contenidos en el lípido resultante. Además, se encontró que el uso del medio de cultivo de "sal sulfato y sulfato de sodio" condujo a un aumento adicional en ambos contenidos.

Ejemplo 13: Cantidad de sal sulfato en cultivo de fermentador de jarra

Se cultivó Mortierella alpina S14 (precultivo durante tres días y cultivo principal durante once días) como en el Ejemplo 12, excepto que el medio de cultivo principal (pH 6,3) contenía glucosa al 2% p/p, polvo de soja al 1,5% p/p, glicerol al 0,02% p/p, aceite de soja al 0,2% p/p, K_2HPO_4 al 0,3% p/p, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ al 0,01% p/p, y $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ al 0,01% p/p. Once días después del comienzo del cultivo principal, se obtuvo una célula seca como en el Ejemplo 1 para la determinación del contenido de DGLA. El peso seco de células microbianas resultante por volumen del medio de cultivo fue de 33,7 mg/mL, el contenido de DGLA por peso seco de células microbianas fue de 209 mg/g, y el contenido de DGLA por unidad de volumen del medio de cultivo fue de 7,03 g/L.

Ejemplo 14: Efecto de la sal sulfato en la producción de ácido araquidónico

Se inoculó aproximadamente un asa de siembra de platino de Mortierella alpina 1S-4 en 100 mL de medio de cultivo de siembra (glucosa al 2% p/p y extracto de levadura al 1% p/p, pH 6,3) y se precultivó durante tres días con movimiento oscilante recíproco a 100 rpm a 28°C. A continuación, se introdujeron 25 L de medio de cultivo principal en un recipiente de cultivo con agitación centrífuga con aireación de 50 L y la mezcla se esterilizó. Después de que toda la solución de cultivo de siembra se inoculara en el recipiente, se llevó a cabo el cultivo a 26°C durante ocho días a una velocidad de aireación de 1 vvm y una velocidad de agitación de 300 rpm. Los principales medios de cultivo, respectivamente, tenían las siguientes composiciones:

(i) Sal cloruro (control):
glucosa al 2% p/p, polvo de soja al 3,1% p/p, glicerol al 0,02% p/p, aceite de soja al 0,1% p/p, K_2HPO_4 al 0,3% p/p, Na_2SO_4 al 0,1% p/p, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ al 0,5% p/p y $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ al 0,5% p/p, pH 6,3
(ii) Sal sulfato:
glucosa al 2% p/p, polvo de soja al 3,1% p/p, glicerol al 0,02% p/p, aceite de soja al 0,1% p/p, K_2HPO_4 al 0,3% p/p, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ al 0,06% p/p y $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ al 0,06% p/p, pH 6,3

La glucosa se suministró de forma continua si era necesario en respuesta al consumo de glucosa, de modo que la glucosa siempre estuviera presente en el medio de cultivo. Cuatro días después del comienzo del cultivo principal, se añadió una solución de sal sódica de ácido succínico de modo que la concentración final fuera de 0,44% p/v. Téngase en cuenta que, el pH del medio de cultivo se ajustó a aproximadamente 6,9 con una solución de NaOH cuatro días después del comienzo del cultivo principal en todos los casos. Ocho días después del comienzo del cultivo principal, se obtuvo una célula seca como en el Ejemplo 1 para la determinación del contenido de ARA. Los resultados se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11

Medios de cultivo	(i) Sal cloruro (control)	(ii) Sal sulfato
Peso seco de células (mg/mL de medio de cultivo)	36,5	39,3
Contenido de ARA por peso de células secas (mg/g de células secas)	159	182
Contenido de ARA por unidad de volumen de medio de cultivo (mg/mL de medio de cultivo)	5,80	7,17
Porcentaje de ARA en ácidos grasos totales (%)	47,0	45,8

Ejemplo Comparativo 2: Cultivo de DGLA con sal cloruro en un recipiente de cultivo de 10 kL

El cultivo de Mortierella alpina S14 se inició con 6000 L en total de la solución de cultivo inicial como en el Ejemplo Comparativo 1, excepto que el medio de cultivo principal (pH 6,3) utilizado contenía glucosa al 2% p/p, polvo de soja al 4% p/p, glicerol al 0,02% p/p, K_2HPO_4 al 0,3% p/p, Na_2SO_4 al 0,1% p/p, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ al 0,5% p/p, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ al 0,5% p/p, aceite de soja al 0,1% p/p, y Adekanate al 0,01% p/p. El cultivo continuó durante 10 días, mientras que la glucosa se suministró continuamente en el primer, segundo, tercer y sexto días de cultivo, de modo que la glucosa siempre estuviera presente en el medio de cultivo. El cuarto día de cultivo principal, se añadió una solución de succinato disódico hexahidratado al 1% p/v (60 kg, aproximadamente 0,44% p/v de ácido succínico) y NaOH (1,26 kg) para ajustar el pH a 6,9.

Después del final del cultivo, se obtuvieron una célula microbiana seca y triglicéridos de ácidos grasos que contenían DGLA como en el Ejemplo Comparativo 1. El peso de la célula microbiana seca resultante por volumen de medio de cultivo fue de 57,3 kg/kL, el contenido de DGLA por peso de la célula microbiana seca fue de 168 g/kg, y el contenido de DGLA por unidad de volumen del medio de cultivo fue de 9,31 kg/kL. Además, el porcentaje de DGLA en los ácidos grasos totales resultantes fue de 41,8%.

Ejemplo 15: Cultivo de DGLA con sal sulfato en un recipiente de cultivo de 10 kL

Se cultivó Mortierella alpina S14 como en el Ejemplo Comparativo 2, excepto que el medio de cultivo principal (pH 6,3) utilizado contenía glucosa al 2% p/p, polvo de soja al 4% p/p, glicerol al 0,02% p/p, K_2HPO_4 al 0,3% p/p, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ al 0,06% p/p, $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ al 0,06% p/p, aceite de soja al 0,1% p/p, y Adekanate al 0,01% p/p.

Después del final del cultivo principal durante diez días, se obtuvieron una célula microbiana seca y triglicéridos de ácidos grasos que contenían DGLA como en el Ejemplo Comparativo 1. El peso de la célula microbiana seca resultante por volumen de medio de cultivo fue de 60,5 kg/kL, el contenido de DGLA por peso de la célula microbiana seca fue de 193 g/kg, y el contenido de DGLA por unidad de volumen de medio de cultivo fue de 11,70 kg/kL. Además, el porcentaje de DGLA en los ácidos grasos totales resultantes fue del 42,3%.

Las cantidades de las células microbianas secas resultantes y los contenidos de DGLA resultantes en el Ejemplo Comparativo 2 y el Ejemplo 15 se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12

	Ejemplo Comparativo 2	Ejemplo 15
Peso celular seco (kg/kL de medio de cultivo)	57,3	60,5
Contenido de DGLA por peso seco de células (g/kg de célula seca)	168	193
Contenido de DGLA por unidad de volumen de medio de cultivo (kg/kL de medio de cultivo)	9,31	11,70
Porcentaje de DGLA en ácidos grasos totales (%)	41,8	42,3

Ejemplo 16-1: Alimento para mascotas I

La célula microbiana seca producida en el Ejemplo 11 se molió. Se añadió la célula microbiana seca molida en una cantidad de 0,5% en peso a una materia prima compuesta por harina de carne, extracto de pollo, maíz, arroz, soja, grasa y aceite vegetal, y una mezcla de vitaminas para producir un alimento para mascotas. El alimento para mascotas resultante (100 g) contenía aproximadamente 120 mg de DGLA, que era un nivel adecuado para su uso.

Ejemplo 16-2: Alimento para mascotas II

Se produjo un alimento para mascotas utilizando una célula microbiana seca producida en el Ejemplo 15, como en el Ejemplo 16-1. El alimento para mascotas resultante (100 g) contenía aproximadamente 97 mg de DGLA, que era un nivel adecuado para su uso.

Ejemplo 17: Alimento de microorganismos para cría de juveniles y larvas de peces

Se cultivaron un rotífero y un camarón en salmuera utilizados como alimento para la cría de juveniles y larvas de peces utilizando la célula microbiana seca molida producida en el Ejemplo 16-1. El método para el crecimiento fue el siguiente: después de colocar 200 mL de agua de mar en una cisterna de 300 mL, se dejaron crecer 100 individuos/1 mL de rotíferos y 20 individuos/1 mL de camarones en salmuera bajo aireación a 23°C mientras se introducían las células microbianas secas en una cantidad que sería 1 g/10^6 rotíferos individuales por día y 1 g/10^5 camarones en salmuera individuales por día. Tanto los rotíferos como los camarones en salmuera consumieron células microbianas secas para su cultivo, lo que dio como resultado alimentos que contenían DGLA. Ambos son aptos para alimentos destinados a la cría de juveniles y larvas de peces.

Ejemplo 18-1: Producción de triglicéridos comestibles purificados I

Las células microbianas secas producidas en el Ejemplo 11 se sometieron a un proceso de purificación extractiva, por ejemplo, extracción con hexano, desgomado, desoxidación, decoloración o desodorización para producir triglicéridos comestibles purificados. El porcentaje de DGLA en los ácidos grasos totales fue de 45,4%. Además, no se detectaron hexano ni metales pesados en el triglicérido, lo que indicaba que el triglicérido era adecuado para grasas y aceites comestibles.

Ejemplo 18-2: Producción de triglicéridos comestibles purificados II

Se produjo un triglicérido comestible purificado utilizando la célula microbiana seca producida en el Ejemplo 15 como en el Ejemplo 18-1. El porcentaje de DGLA en los ácidos grasos totales fue de 42,0%. Además, no se detectaron hexano ni metales pesados en el triglicérido, lo que indicaba que el triglicérido era adecuado para grasas y aceites comestibles.

Ejemplo 19: Preparación de cápsulas que contienen grasa y aceite extraídos de células microbianas secas

Se mezclaron gelatina (fabricada por Nitta Gelatin Inc.) y glicerol para aditivos alimentarios (fabricado por Kao Corporation) a una razón en peso de 100:35 y se disolvieron en agua a una temperatura de 50 a 60°C para preparar un recubrimiento de gelatina con una viscosidad de 2000 cp. A continuación, el triglicérido comestible purificado producido en el Ejemplo 18-1 o 18-2 y el aceite de vitamina E (fabricado por Eisai Co., Ltd.) se mezclaron a una razón en peso de 100:0,05 para preparar un contenido. Utilizando el recubrimiento y el contenido, se llevaron a cabo la encapsulación y el secado mediante una operación ordinaria para producir una cápsula blanda que tenía un contenido de 180 mg/cápsula. Esta cápsula blanda era adecuada para la administración oral.

Ejemplo 20: Preparación de una bebida que contiene grasa y aceite extraídos de células microbianas secas

Se mezclaron triglicérido comestible purificado producido en el Ejemplo 18-1 y lecitina de soja (fabricada por Tsuji Oil Mill Co., Ltd.) a una razón en peso de 9:1 y se dispersaron uniformemente en agua para preparar una dispersión de liposomas. Esta dispersión de liposomas se añadió en una cantidad de 1/100 de volumen a zumo de naranja, agua con gas, café, leche, leche de soja y sopa espesa para preparar (producir) bebidas como alimentos de acuerdo con la presente invención. Todas estas bebidas eran adecuadas para la ingesta oral.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir ácido araquidónico (ARA) y/o ácido dihomo-gamma-linolénico (DGLA), comprendiendo el método el cultivo *Mortierella alpina* capaz de producir ácido araquidónico (ARA) y/o ácido dihomo-gamma-linolénico (DGLA), comprendiendo el método adicionalmente:

(a) añadir un ácido orgánico seleccionado del grupo que consiste en ácido succínico, ácido fumárico, ácido pirúvico y ácido málico, o una mezcla de los mismos en una cantidad de 0,01 a 5% p/v a un medio de cultivo tres días o más tarde después del comienzo del cultivo principal.

2. El método según la Reivindicación 1, que comprende adicionalmente

(b) aumentar el pH del medio de cultivo al intervalo de 6,9 a 7,2 tres días o más tarde después del comienzo del cultivo principal; y/o
(c) añadir un sulfato metálico seleccionado del grupo que consiste en $MgSO_4$, $CaSO_4$, K_2SO_4, $FeSO_4$ y $MnSO_4$, o una mezcla de los mismos en una cantidad de 0,01 a 0,5% p/p al medio de cultivo principal.

3. Un método según la Reivindicación 2, en donde método comprende al menos la etapa (a) y la etapa (b), y en donde la etapa (a) y la etapa (b) se llevan a cabo en diferentes momentos desde la adición de una fuente de carbono al medio de cultivo.

4. Un método según la Reivindicación 2 o 3, en donde el método comprende al menos la etapa (a) y la etapa (c), y en donde la etapa (c) se lleva a cabo antes de la adición de un medio de cultivo de siembra.

Fig. 1A

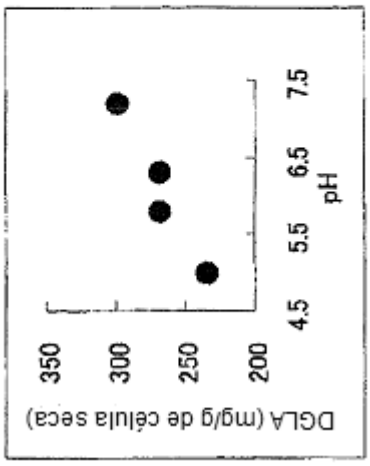

Fig. 1B

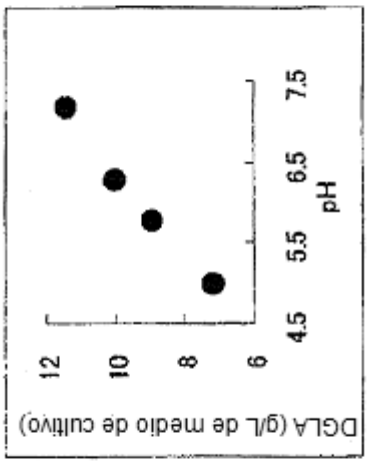

Fig. 1C

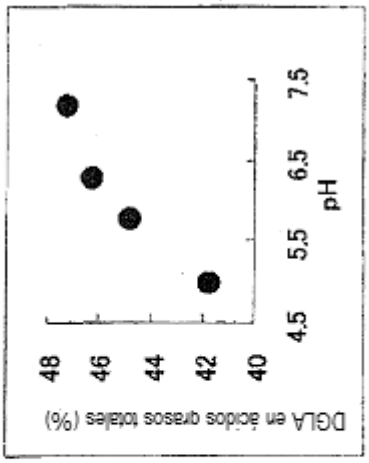

Fig. 2A

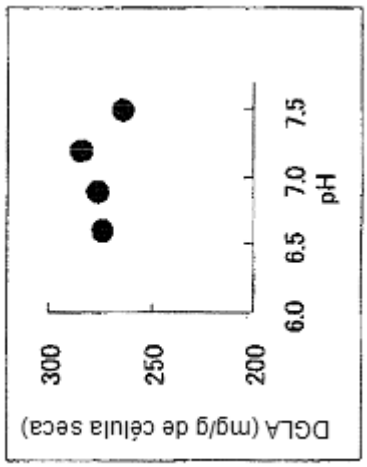

Fig. 2B

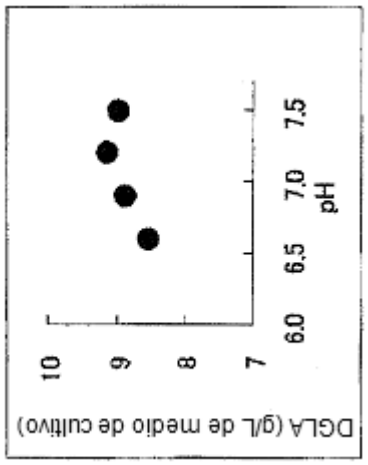
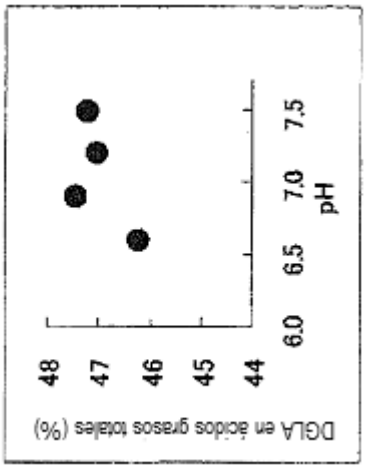
Fig. 2C