



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 285 633**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/64** (2006.01)

**A23D 9/00** (2006.01)

**A23C 11/04** (2006.01)

**A61K 31/20** (2006.01)

**A23L 1/30** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **05077139 .3**

86 Fecha de presentación : **22.01.1992**

87 Número de publicación de la solicitud: **1642983**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **05.04.2006**

54

Título: **Ácido araquidónico y métodos para la producción y uso del mismo.**

30

Prioridad: **24.01.1991 US 645454**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.11.2007**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.11.2007**

73

Titular/es: **MARTEK BIOSCIENCES CORPORATION**  
**6480 Dobbin Road**  
**Columbia, Maryland 21045, US**

72

Inventor/es: **Kyle, David J.**

74

Agente: **Izquierdo Faces, José**

ES 2 285 633 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

Ácido araquidónico y métodos para la producción y uso del mismo.

5 Esta invención hace referencia a un método para proporcionar ácido araquidónico a una fórmula infantil, y a una fórmula infantil que contiene ácido araquidónico que contiene aceite de hongos.

10 El ácido araquidónico (ARA) es un ácido graso poliinsaturado de cadena larga (PUFA) de la clase omega-6 (ácido eicosatetraenoico-5, 8, 11, 14, esto es, 20:4). ARA es el PUFA C<sub>20</sub> más abundante en el cuerpo humano. Aparece de forma especialmente frecuente en los tejidos sanguíneos, musculares y orgánicos, haciendo un papel fundamental como un lípido estructural asociado predominantemente con los fosfolípidos de la sangre, hígado, músculo y otros sistemas orgánicos importantes. Además de su papel principal como lípido estructural, ARA también es el precursor directo de cierto número de eicosanoides circulantes como pueden ser la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), la prostaciclina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>), el tromboxano A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>), y los leucotrienos B<sub>4</sub>, (LTB<sub>4</sub>) y C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>). Estos eicosanoides muestran efectos reguladores sobre el metabolismo lipoproteico, la reología sanguínea, el tono vascular, la función leucocitaria y la activación plaquetaria.

20 A pesar de su importancia para el metabolismo humano, el ARA no puede ser sintetizado en los humanos *de novo*. El ARA es sintetizado mediante el alargamiento y desaturación del ácido linoleico (LOA), un ácido graso esencial. Este proceso requiere la presencia de la enzima  $\Delta$ 6-desaturasa, una enzima presente en el cuerpo humano en niveles bajos, Burre *et al.*, *Lipids*, 25:354-356 (1990). Por consiguiente, la mayoría del ARA debe proporcionarse en la dieta, y esto es especialmente importante durante los periodos de rápido crecimiento corporal, como es la infancia.

25 Durante el primer año de su vida, un bebé puede doblar o triplicar su peso. Por consiguiente, se requieren niveles elevados de ARA alimenticio. Para satisfacer esta creciente necesidad, la leche materna humana contiene niveles altos de ARA. Sanders *et al.*, *Am. J. Clin. Nutr.*, 31:805-813 (1978). El ARA es el PUFA C<sub>20</sub> más abundante en la leche materna. De las madres, especialmente las vegetarianas, que dan el pecho a sus bebés, muchas se beneficiarían del ARA alimenticio adicional. Sin embargo, muchas madres no dan el pecho a sus bebés, o no les dan el pecho durante todo el periodo en el que se produce el rápido crecimiento del bebé, eligiendo utilizar en su lugar una fórmula infantil.

30 El Solicitante no conoce ninguna fórmula infantil comercial que contenga ARA. La Patente estadounidense N° 4.670.285 (Clandinin *et al.*), revela la necesidad del bebé de recibir ácidos grasos incluyendo el ARA. Para proporcionar estos ácidos grasos, Clandinin *et al.* sugieren una mezcla de yema de huevo, aceite de pescado o fosfolípidos de los glóbulos rojos y aceites vegetales como el componente graso de una fórmula infantil que se propone. Sin embargo, el aceite de pescado contiene elevadas cantidades de ácido eicosapentaenoico (EPA). Se sabe que el EPA reduce la síntesis del ARA en los bebés. Carlson, *et al.*, *INFORM*, 1:306 (1990). Por lo tanto, sería conveniente ser capaces de proporcionar ARA sin también proporcionar EPA adicional. Además, las yemas de huevo contienen una concentración relativamente baja de ARA, de tal modo que la mezcla de Clandinin *et al.* no es viable desde el punto de vista económico.

45 Debido a que el ARA está presente en los aceites animales y no en los vegetales, su producción en cantidades comerciales ha permanecido como un objetivo deseable pero difícil de alcanzar. Shinmen, *et al.*, *Microbiol. Biotech.* 31:11-16 (1989), han hablado sobre la producción de ARA mediante un hongo aislado, *Mortierella alpina*, utilizando una fermentación en recipiente agitado convencional. (Véase también la Patente japonesa 1.215.245 de Shinmen *et al.*). Después del cultivo, los organismos se recogen, se secan y se extraen sus lípidos de la biomasa fúngica con un disolvente orgánico y los lípidos son modificados químicamente (covalentemente). Por ejemplo, la mezcla de lípidos es hidrolizada o convertida en ésteres etílicos y después combinados con ciclodextrina antes de ser utilizados como complemento alimenticio. Shinmen *et al.* no revelan ni sugieren la administración de aceites microbianos no modificados.

50 La *Porphyridium cruentum*, una microalga roja, puede cultivarse en estanques en grandes cantidades y posee un contenido de lípidos que puede contener hasta un 40% de ARA. Ahern, *et al. Biotech. Bioeng.* 25:1057-1070 (1983). Desgraciadamente, el ARA está asociado fundamentalmente con los galactolípidos, un lípido polar complejo que no está presente en la leche materna. Por consiguiente, el ARA utilizable total producido no es solamente una fracción del uno por ciento de la biomasa, sino que además la forma del ARA no es adecuada para su uso como aditivo para la fórmula infantil sin modificación adicional.

60 La Patente estadounidense N° 4.870.011 (Suzuki *et al.*) revela un método para obtener lípidos tales como el ácido  $\gamma$ -linolénico de hongos del género *Mortierella*. El ácido  $\gamma$ -linolénico es purificado de la mezcla de lípidos contenidos en los hongos.

65 DE 3603000A1 (Milupa) revela una mezcla de grasa de ácidos altamente poliinsaturados y su uso como el componente graso de una fórmula infantil. La mezcla de grasa posee un alto contenido de ARA y ácidos docosahexaenoicos (DHA) en una proporción de 2,5:1 respectivamente, así como un elevado contenido de colesterol. Entre las fuentes de los ácidos grasos figuran ciertos tipos de microalgas, aceites de pescado, grasas orgánicas de la carne de vaca o cerdo o aceite de yema de huevo altamente refinado. Se dice que una fuente del DHA y del ARA son las microalgas de los

tipos Rodófitas y Facófitas. No existe ninguna teoría sobre utilizar cualquier tipo de microbio como fuente de aceite. Los aceites de pescado y de algas también incluyen normalmente EPA que reduce la síntesis de ARA *in vivo*. Además, el aceite de yema de huevo altamente refinado no es una fuente económica del ARA. Más aún, no se revela nada allí sobre un aditivo concentrado de ARA para complementar una fórmula infantil ya existente.

5

JP-A-01196255 (Suntory) revela una fórmula infantil complementada con ARA y EPA, que pueden ser producidas por la Mortierella, para parecerse a la leche materna humana. Sin embargo, no se reconoce la necesidad de mantener un bajo contenido de EPA, a la vez que se proporciona una gran cantidad de ARA.

10

En consecuencia, persiste una necesidad de encontrar un método económico y comercialmente viable de producir ARA, preferiblemente sin producción concomitante de EPA, para su uso en una fórmula infantil de manera que los niveles de ARA de la fórmula se aproximen a los niveles presentes en la leche materna humana. Es objeto de la presente invención el satisfacer esa necesidad.

### 15 **Resumen de la invención**

Esta invención hace referencia a la producción y uso de ácido araquidónico que contenga aceite de hongos (ARASCO) y a una fórmula infantil que contenga dichos aceites. Nos podemos referir al aceite como un aceite unicelular. Los hongos se cultivan bajo condiciones de producción de aceite, se recogen y se extrae y recupera el aceite. El aceite, sin modificación química adicional, se puede usar directamente para proporcionar un complemento de ARA a bebés recién nacidos. Entre las ventajas de la invención se incluyen su facilidad de producción, y su alto grado de pureza, y la no presencia de cantidades detectables de EPA.

### 25 **Descripción detallada de la realización preferente de la invención**

La presente invención logra proporcionar una fuente económica de ácido araquidónico (ARA). En una realización, esta invención hace referencia a un método para proporcionar un aceite de hongos que contenga ácido araquidónico (ARASCO) que esté libre de forma sustancial de ácido eicosapentaenoico (EPA) a una fórmula infantil. Tal y como se utiliza en el presente documento, “libre de forma sustancial” significa que el EPA está presente en menos de alrededor de una quinta parte de la cantidad de ARA en el aceite. Este aceite, un aceite unicelular, se puede administrar directamente, sin modificar su forma. Tal y como se utiliza en el presente documento, “sin modificar” significa que las propiedades químicas de los ácidos grasos, o de los aceites mismos, no han sido alterados de forma covalente. Así, por ejemplo, una modificación temporal del ARASCO o ARA que podría invertirse si se incorpora el aceite no estaría fuera del alcance de esta invención.

35

(Tabla pasa a página siguiente)

40

45

50

55

60

65

ES 2 285 633 T3

TABLA 1

Composición de los Ácidos Grasos de Varias Especies de Hongos

especies	Ácido Graso								total grasa
	14:0	16:0	16:1	18:1	18:2	18:2	20:4	20:5	
<i>Mortierella alpina</i>	--	8,2	--	33,5	16,3	23,3	13,0	--	3,0
<i>Mortierella elongata</i>	2,0	13,2	--	26,6	11,9	13,2	13,8	2,4	4,0
<i>Mortierella isabellina</i>	0,3	15,7	0,8	55,8	11,1	9,0	--	--	7,3
<i>Saprolognia perasitica</i>	7,4	19,1	1,9	6,3	24,5	12,5	10,5	10,5	9,3
<i>Pythium catenulatum</i>	6,5	9,9	10,3	21,2	18,5	3,5	13,4	10,9	5,0
<i>Pythium coloratum</i>	13,6	9,9	--	14,7	10,9	2,5	24,3	21,7	2,2
<i>Pythium gracile</i>	14,7	9,1	2,2	14,8	12,6	3,6	22,1	5,7	4,5
<i>Pythium irregulare</i>	10,3	15,4	6,9	12,3	21,0	3,9	10,6	12,4	11,9
<i>Pythium ultimum</i>	9,5	16,7	10,5	17,1	20,7	1,3	9,0	6,9	13,3
<i>Pythium insidiosum</i>	9,5	11,4	12,1	1,0	8,3	9,3	31,9	--	2,8

De las especies de hongos de cuyos ácidos grasos se han dado las características más arriba, se ha descubierto que la mayoría no produce ARA. Weete, J.D., *Fungal Lipid Biochemistry*, Plenum Press, N.Y. (1974). De las especies que producen ARA, muchas, incluyendo todas las especies que se han caracterizado arriba como *Pythium*, producen cantidades significativas de ácido eicosapentaenoico (EPA) además del ARA. La Tabla 1 expone el perfil de los ácidos grasos de especies de hongos. Como ocurre en los aceites de pescado, unos niveles elevados de ARA en complementos alimenticios dan como resultado una reducción de la capacidad de formar ARA a partir de ácido linoleico alimenticio (LOA). En consecuencia, es preferible utilizar una especie que no produzca cantidades significativas de EPA, tal como la *Mortierella alpina*. Esta especie está disponible de forma comercial y está depositada en la "American Type Culture Collective" (Colección Americana de Tipos de Cultivos) en Rockville, Maryland, con el número de acceso 42430.

Uno de los problemas más importantes que soluciona la presente invención, es la reducción de la biosíntesis de ARA en los bebés causada por la presencia de niveles alimenticios aumentados de EPA. Este problema se puede corregir proporcionando ARA para su utilización en la fórmula infantil en niveles sustancialmente similares a aquellos que se encuentran en la leche materna humana. Normalmente en la leche materna humana, la proporción de ARA:EPA es de alrededor de 20:1 respectivamente. La presente invención considera de forma específica un aceite microbiano extraído de la *Mortierella alpina* y que proporciona una cantidad suficiente de ARA como para contrarrestar los efectos negativos del EPA alimenticio. Preferentemente, el uso de aceite que contenga ARA dará como resultado una proporción de ARA:EPA de al menos alrededor de 5:1. Más preferentemente, la proporción será al menos de alrededor de 10:1 y, lo más preferible, es que sea de al menos alrededor de 20:1. Tal y como se puede observar, cuanto más cantidad de ARA haya en el producto final, con respecto a la cantidad de EPA, el resultado será más conveniente.

## ES 2 285 633 T3

En un proceso de la presente invención, los hongos de la especie *Mortierella alpina* se cultivan bajo condiciones adecuadas de cultivo que produzcan aceite que contenga ARA. En general, las técnicas del cultivo de hongos son bien conocidas para aquellos que son expertos en la técnica y esas técnicas se pueden aplicar al proceso inventivo presente. Por ejemplo, el cultivo de una cantidad inoculadora de hongo puede producirse en un cultivo sumergido en matraces oscilantes. Se proporciona un medio de crecimiento al matraz, se siembra con micelio fúngico, y se cultiva en un agitador oscilante de tres a cuatro días aproximadamente.

La composición del medio de crecimiento puede variar pero siempre contiene fuentes de nitrógeno y carbono. Una fuente preferente de carbono es la glucosa, las cantidades de ésta pueden estar comprendidas entre los 10 y 100 gramos aproximadamente de glucosa por litro del medio de crecimiento. Normalmente se utilizan unos 15 gramos/litro para el cultivo en matraz oscilante. La cantidad puede variar dependiendo de la densidad deseada del cultivo final. Entre otras fuentes de carbono que se pueden utilizar se incluye la melaza, el jarabe de maíz con alto contenido de fructosa, el almidón hidrolizado o cualquier otra fuente de carbono convencional de bajo coste que se utilice en los procesos de fermentación. Las cantidades adecuadas de estas fuentes de carbono pueden ser determinadas fácilmente por aquellos que son expertos en la técnica. Normalmente, se necesita añadir carbono adicional durante el curso del cultivo. Esto se hace porque los organismos utilizan tanto carbono que añadirlo todo en un lote podría resultar de difícil manejo.

Normalmente se proporciona nitrógeno en forma de extracto de levadura en una concentración de unos 2 a unos 15 gramos de extracto por litro del medio de crecimiento. Preferentemente, se proporcionan unos cuatro gramos por litro. Se pueden utilizar otras fuentes de nitrógeno, entre las que se incluyen la peptona, triptona, el licor de maíz fermentado, etc. La cantidad que se necesita añadir de estas fuentes puede ser determinada fácilmente por aquellos que son expertos en la técnica. El nitrógeno se puede añadir todo en un lote, esto es, todo a la vez antes del cultivo.

Después de cultivarlo durante 3-4 días a una temperatura adecuada, normalmente a unos 25-30°C, se tendrá una cantidad de hongos que es suficiente para utilizarlo como inóculo en un fermentador de recipiente agitado convencional. Tales fermentadores son conocidos por aquellos que son expertos en la técnica y están disponibles comercialmente. La fermentación se puede llevar a cabo en modo de lote, lote alimentado (fed-batch) o de fermentación continua. Preferentemente, el fermentador de recipiente agitado estará equipado con un rotor de turbina de tipo Rushton.

El fermentador se prepara añadiendo las fuentes de nitrógeno y carbono deseadas. Por ejemplo, un fermentador de 1,5 litros se puede preparar mezclando alrededor de 50 gramos de glucosa y alrededor de 15 gramos de extracto de levadura por litro de agua corriente. Tal y como se ha dicho anteriormente, se pueden utilizar otras fuentes de nitrógeno o carbono o mezclas de las mismas.

El reactor que contiene la solución nutritiva deberá ser esterilizado calentándolo, por ejemplo, antes de la inoculación. Después de que se haya enfriado hasta llegar a unos 30°C, se puede añadir el inóculo, y se puede iniciar el cultivo. Se proporciona un intercambio gaseoso mediante la inyección de aire. La proporción de inyección de aire puede variar, pero preferentemente se ajusta de unos 0,5 a unos 4,0 WM (volumen de aire por volumen de fermentador por minuto). Preferentemente la concentración en oxígeno disuelto se mantiene del 10% al 15% aproximadamente del valor de saturación del aire de la solución. En consecuencia, puede que se requieran ajustes en la proporción de la inyección durante el cultivo. Es aconsejable agitarlo. La agitación la proporciona el rotor. La velocidad periférica de la agitación se fija preferentemente dentro de la gama de entre unos 50 cm/seg. a unos 500 cm/seg., preferentemente de entre unos 100 a 200 cm/seg.

En general, la cantidad de inóculo puede variar. Normalmente, se puede utilizar desde alrededor del 2% a alrededor del 10% por volumen de inóculo. Preferentemente, se puede utilizar alrededor del 5% por volumen de inóculo en un tren semillas del fermentador.

Se deberán supervisar los niveles nutritivos. Cuando los niveles de glucosa caen por debajo de 5 g/l, se deberá añadir glucosa adicional. Un ciclo típico de cultivo utiliza unos 100 gramos de glucosa y unos 15 gramos de extracto de levadura por litro. Es aconsejable disminuir el nitrógeno durante el curso del cultivo ya que esto aumenta la producción de aceite mediante los hongos *M. alpina*.

Ocasionalmente, el cultivo producirá una cantidad excesiva de espuma. De forma opcional, se puede añadir un agente antiespumante para impedir la formación de espuma, como los que conocen aquellos que son expertos en la técnica, por ejemplo Mazu 310®.

La temperatura del cultivo puede variar. Sin embargo, los hongos que producen tanto ARA como EPA tienden a producir menos EPA y más ARA cuando se cultivan a temperaturas más altas. De este modo, cuando la *Mortierella alpina* se cultiva a menos de 18°C, comienza a producir EPA. Por consiguiente, es preferible mantener la temperatura a un nivel que induzca a la producción preferente de ARA. Las temperaturas adecuadas van normalmente de unos 25°C a unos 30°C.

Preferentemente, el cultivo continúa hasta que se consigue la densidad deseada de biomasa. Una biomasa deseable está entorno a los 25 g/l del organismo. Tal biomasa se obtiene normalmente dentro de las 48-72 horas siguientes a la inoculación. En esos momentos, los organismos normalmente contienen alrededor de 5-40% de lípidos complejos, esto es, aceite, de los que alrededor del 10-40% es ARA, y se pueden recoger.

## ES 2 285 633 T3

La recogida se puede realizar mediante cualquier método adecuado como, por ejemplo, filtración, centrifugación, o deshidratación por aspersion. Debido a su menor coste, puede preferirse la filtración.

5 Tras la recogida, se puede extraer la masa micelial. La masa micelial hace referencia a la cantidad de biomasa que resulta tras la recogida. La masa puede estar suelta o prensada, desmenuzada o no. De manera opcional, a la masa se le puede quitar cualquier resto de agua, mediante vacuosecado o liofilización, antes de la extracción. Si se elige esta opción, es preferible utilizar disolventes apolares para extraer el aceite que contiene ARA. Aunque cualquier extracto apolar es adecuado, se prefiere el hexano.

10 De manera alternativa, la masa húmeda (que normalmente contiene alrededor de 30-50% de sólidos) se puede desmenuzar y extraer directamente utilizando disolventes polares tales como el etanol o el alcohol isopropílico, o una extracción de fluidos supercríticos con disolventes tales como CO<sub>2</sub> o NO. Preferentemente, las masas se desmenuzan antes de la extracción. Como ventaja, la presente invención permite el uso económico de técnicas de extracción de fluidos supercríticos. McHugh, *et al.*, *Supercritical Fluid Extraction*, Butterworth (1986). Tales técnicas son conocidas  
15 por aquellos que son expertos en la técnica e incluyen las que se aplican actualmente, por ejemplo, para descafeinar los granos de café. Aunque el rendimiento de las extracciones en seco y húmedo son similares, la extracción en húmedo generalmente es un proceso más económico.

20 Un método preferente de extracción acuosa supone mezclar la biomasa micelial con el disolvente polar, el alcohol isopropílico, en una caldera de reacción adecuada. Dichas calderas son conocidas. Es aconsejable utilizar de tres a seis partes de disolvente por cada parte de biomasa. Más preferentemente, la mezcla se hace bajo nitrógeno o en presencia de antioxidantes para impedir la oxidación del ARA en el extracto de lípidos. Tal y como se utilizan en el presente documento, “extracto de lípidos”, “aceite”, “complejo lípido” y “aceite de hongo” se utilizan indistintamente.

25 Tras extraerla, la mezcla se puede filtrar para sacar la biomasa del disolvente que contiene el extracto de lípidos.

El disolvente se separa del extracto de lípidos y también se puede recuperar para reutilizarlo, mediante evaporación en un colector adecuado, dejando a lo que en el presente documento se hace referencia como “aceite crudo”. La  
30 utilización del alcohol isopropílico como el disolvente da el resultado deseable de poder quitar cualquier resto de agua del aceite crudo, ya que la evaporación quita el azeótropo del alcohol isopropílico/agua que se ha formado de manera espontánea.

Aunque el aceite crudo se puede utilizar sin necesitar tratamiento adicional, también puede purificarse más. Pro-  
35 cesos tales como los utilizados en la preparación de lecitina a partir de productos vegetales, y conocidos por aquellos que son expertos en la técnica, se pueden utilizar en este paso adicional de purificación. Tales procesos no modifican de manera química o covalente los lípidos que contienen ARA o el ARA en sí.

Los rendimientos varían, pero normalmente se pueden obtener de 10-30 gramos de triglicérido por 100 gramos de micelia seca. Se pueden utilizar el aceite crudo o el producto refinado para su administración a los humanos. Ambos  
40 serán incluidos dentro de la definición de ARASCO tal y como se utiliza en el presente documento.

Un objeto de la invención es el de proveer a las fórmulas infantiles humanas, de tal manera que la concentración de ARA en dicha fórmula se aproxime bastante a la concentración de ARA en la leche materna humana. La Tabla 2  
45 compara la composición de los ácidos grasos en ARASCO con los presentes en la leche materna y la fórmula infantil con y sin ARASCO.

50 (Tabla pasa a página siguiente)

55

60

65

## ES 2 285 633 T3

TABLA 2

*Composición de ácidos grasos de productos de aceite de hongos y la leche materna*

Ácido Graso	ARASCO	Fórmula infantil <sup>1</sup>	Fórmula + aceite	Leche materna <sup>1</sup>
8:0	--	24,1	23,6	0,35
10:0	--	17,7	17,3	1,39
12:0	--	14,9	14,6	6,99
14:0	4,6	5,8	5,8	7,96
16:0	16,0	6,8	7,0	19,80
16:1	3,2	0,2	0,3	3,20
18:0	--	2,3	2,3	5,91
18:1	26,4	10,0	10,3	34,82
18:2n6	9,9	17,4	17,3	16,00
18:3n3	4,1	0,9	1,0	0,62
20:1	2,2	1	0,14	1,10
20:2n6	--	--	--	0,61
20:2n6	1,4	--	0,03	0,42
20:4n6	32,0	--	0,64	0,59
20:5n3	--	--	--	0,03
22:1	--	--	--	0,10
22:4n6	--	--	--	0,21
22:5n6	--	--	--	0,22
22:6n3	--	--	--	0,19
<sup>1</sup> Simopoulos, A., <u>Omega-3 Fatty Acids in Health and Disease</u> , pp. 115-156 (1990)				

Tal y como se puede ver, la cantidad de ARA presente en la fórmula infantil complementada con ARASCO se aproxima bastante a los niveles de ARA de la leche materna humana. De forma adicional, la composición total de ácidos grasos de la fórmula infantil no ha sido alterada de forma significativa mediante la adición del ARASCO. Se pueden utilizar entre 50 y unos 1000 mg de ARASCO por litro de fórmula infantil. La cantidad específica de ARASCO requerida depende del contenido de ARA. Ésta puede variar desde alrededor del 10 al 50% de los ácidos grasos presentes en el aceite. Sin embargo, normalmente el contenido de ARA es de alrededor del 30%. Cuando el contenido de ARA es de alrededor del 30%, una proporción de complementación especialmente preferente es de alrededor de 600 a 700 mg de ARASCO por litro de fórmula infantil. Tal proporción diluye los componentes grasos previamente existentes de una fórmula infantil tal como Similac® (Ross laboratorios, Columbus, Ohio) por solamente una parte de ARASCO en cincuenta partes de aceites de fórmula. Preferentemente, el ARASCO deberá estar libre de EPA de forma sustancial.

En el proceso descrito, el aceite que contiene ARA es predominantemente triglicérido. Esta forma de ARASCO es útil como aditivo en una fórmula infantil. El aceite de la *M. alpina* lo más probable es que sea económico de producir.

Habiendo descrito la invención de forma general, se expone el siguiente ejemplo específico pero no restrictivo para ilustrar la invención de forma adicional.

## ES 2 285 633 T3

### Ejemplo 1

#### *Preparación de lípido de M. alpina y adición a una fórmula infantil*

- 5 La *Mortierella alpina* (ATCC n° 42430) ha sido cultivada en un matraz oscilante de 2 litros que contiene 1 litro de agua corriente y 20 gramos de medio de dextrosa de patata. El matraz estaba en constante agitación orbital y se mantuvo a 25°C durante siete días. Después de recogerlo mediante centrifugación, la biomasa fue liofilizada consiguiendo un rendimiento de unos 8 gramos de micelia rica en lípidos. La micelia fue extraída utilizando hexano con un  
10 1 litro de hexano por 200 gramos de biomasa seca a temperatura ambiente con agitación continua durante 2 horas y dio como resultado alrededor de 2,4 g de aceite crudo. Este aceite contiene alrededor del 23% de ácido araquidónico y fue añadido a la fórmula comercial Similac® gota a gota en concentraciones de 1000 mg por litro.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para proporcionar ácido araquidónico (ARA) a una fórmula infantil en el que:

5 Se cultiva *Mortierella alpina* bajo condiciones de producción de aceite y se recoge; el aceite se extrae y se recupera para producir un aceite de hongos que contenga ARA (ARASCO) que es predominantemente triglicérido y en el que

10 (i) EPA esté presente en menos de una quinta parte de la cantidad de ARA en el ARASCO y

(ii) el contenido de ARA es del 10 al 50% de los ácidos grasos en el ARASCO; y

15 dicha fórmula infantil se complementa con entre 50 y 1000 mg de ARASCO no modificado por litro de fórmula infantil.

2. El método de conformidad con la reivindicación 1, en el que la proporción de ARA:EPA en la fórmula infantil complementada con el ARASCO es de al menos 5:1.

20 3. El método de conformidad con la reivindicación 2, en el que la proporción de ARA:EPA en la fórmula infantil complementada con el ARASCO es de al menos 10:1.

4. El método de conformidad con la reivindicación 3, en el que la proporción de ARA:EPA en la fórmula infantil complementada con el ARASCO es de al menos 20:1.

25 5. El método de conformidad con cualquier reivindicación anterior, en el que el ARASCO esté refinado.

6. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 5, en el que la recogida da como resultado una masa micelial, y en el que la masa tiene cualquier resto de agua que se quita antes de la extracción.

30 7. El método de conformidad con la reivindicación 6, en el que un disolvente apolar se utiliza para extraer el ARASCO.

8. El método de conformidad con la reivindicación 7, en el que el disolvente apolar es hexano.

35 9. El método de conformidad con cualquier reivindicación anterior, en el que la recogida da como resultado una masa micelial, y en el que la masa está suelta o prensada, desmenuzada o no.

40 10. El método de conformidad con cualquier reivindicación anterior, en el que la *Mortierella alpina* se cultiva a temperaturas de entre 25°C y 30°C.

11. El método de conformidad con cualquier reivindicación anterior, en el que el medio de crecimiento contiene glucosa, melaza, jarabe de maíz con alto contenido de fructosa, o almidón hidrolizado.

45 12. El método de conformidad con cualquier reivindicación anterior, en el que el medio de crecimiento contiene de 10-100 gramos de glucosa por litro del medio de crecimiento.

13. El método de conformidad con cualquier reivindicación anterior, en el que se añade carbono durante el curso del cultivo.

50 14. El método de conformidad con cualquier reivindicación anterior, en el que el medio de crecimiento contiene peptona, triptona o licor de maíz fermentado.

55 15. El método de conformidad con cualquier reivindicación anterior, en el que el medio de crecimiento contiene extracto de levadura a una concentración de entre 2 y 15 gramos por litro del medio de crecimiento.

16. El método de conformidad con cualquier reivindicación anterior, en el que se disminuye la cantidad de nitrógeno durante el curso del cultivo.

60 17. El método de conformidad con cualquier reivindicación anterior, en el que se proporciona agitación mediante un rotor.

65 18. Fórmula infantil que está compuesta de entre 50 y 1000 mg por litro de fórmula infantil de un ácido araquidónico (ARA) que contiene aceite de hongos, producido por la *Mortierella alpina*, en ese aceite (i) EPA está presente en menos de una quinta parte de la cantidad de ARA en el aceite, (ii) el contenido de ARA es del 10 al 50% de los ácidos grasos del aceite, y (iii) en el que el aceite es predominantemente triglicérido y no está modificado.

## ES 2 285 633 T3

19. Fórmula infantil de conformidad con la reivindicación 18, en la que la proporción de ARA:EPA en la fórmula es de al menos 5:1.

5 20. Fórmula infantil de conformidad con la reivindicación 19, en la que la proporción de ARA:EPA en la fórmula es de al menos 10:1.

21. Fórmula infantil de conformidad con la reivindicación 20, en la que la proporción de ARA:EPA en la fórmula es de al menos 20:1.

10 22. Fórmula infantil de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 18-21, en la que el aceite está refinado.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65