



(10) **DE 697 38 377 T3** 2015.11.05

(12) **Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 956 774 B2**

(51) Int Cl.: **A23D 9/007** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 38 377.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/JP97/03631**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 94 3165.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1998/016119**

(86) PCT-Anmeldetag: **09.10.1997**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **23.04.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **17.11.1999**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **12.12.2007**

(97) Veröffentlichungstag  
des geänderten Patents beim EPA: **24.06.2015**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **05.11.2015**

**Patentschrift wurde im Einspruchsverfahren geändert**

(30) Unionspriorität:

**28917296**                      **11.10.1996**      **JP**

(73) Patentinhaber:

**Nippon Suisan Kaisha, Ltd., Tokio/Tokyo, JP;**  
**Suntory Holdings Ltd., Osaka, JP**

(74) Vertreter:

**TBK, 80336 München, DE**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,**  
**LU, MC, NL, PT, SE, AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI,**  
**FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**HIGASHIYAMA, Kenichi, Mishima-gun Osaka 618,**  
**JP; AKIMOTO, Kengo, Mishima-gun Osaka 618,**  
**JP; SHIMIZU, Sakayu, Kyoto-shi Kyoto 616, JP;**  
**DOISAKI, Nobushige, Hachioji-shi Tokio 192, JP;**  
**FURIHATA, Kiyomi, Hachioji-shi Tokio 192, JP**

(54) Bezeichnung: **ARACHIDONSÄURE ENTHALTENDE ESSBARE FETTE UND DIESE ENTHALTENDE NAHRUNGSMITTEL**

**Beschreibung**

## TECHNISCHES GEBIET

**[0001]** Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein essbares Öl, das aus Mikroorganismen erhalten wird, die zu der Untergattung *Mortierella* der Gattung *Mortierella* gehören, und in der Lage sind, Arachidonsäure zu produzieren, aber nur wenig nicht verseifbare Stoffe enthält. Diese Erfindung bezieht sich auf ein Lebensmittel, die das Arachidonsäure enthaltene, essbare Öl enthalten, insbesondere auf Formulierungen für Kleinkinder (Kinderformulierung).

**[0002]** In dieser Erfindung bedeuten „nicht verseifbare Stoffe“ die, die aus Mikroorganismen stammenden. Daher bezeichnet der Begriff „nicht verseifbare Stoffe“ in der Beschreibung nur die, die aus Mikroorganismen stammen und frei von künstlich zugesetzten sind.

## STAND DER TECHNIK

**[0003]** Arachidonsäure zog als ein Vorläufer von Prostaglandinen, Thromboxan, Prostacyclin, Leukotrienen usw. Aufmerksamkeit auf sich, welche wirkungsvolle und vielfältige physiologische Wirkungen einschließlich Uterinmuskelkontraktion, Relaxation, Vasodilatation (Gefäßerweiterung) und Blutdruck senkende Wirkung hat. Zusammen mit DHA (Docosahexaensäure) wurde es umfassend und intensiv insbesondere als eine für das Wachstum von Kindern wesentliche Substanz untersucht. Zum Beispiel verfolgte Lanting et al. das Wachstum von Kindern bis zum Alter von 9 Jahren, welche mit Muttermilch oder mit Milchpulver für Kinder für mehr als 3 Wochen nach der Geburt gefüttert wurden, untersuchte das Auftreten von geringfügigen Beeinträchtigungen im Hirnnerv in diesen Kleinkindern auf der Grundlage ihres Verhaltens usw., und fand heraus, dass das Auftreten von Encephalopathien in den Kleinkindern, die mit Milchpulver für Kleinkinder gefüttert wurden, etwa zweimal so hoch war wie bei denen, die mit Muttermilch gefüttert wurden [LANCET, Bd. 344, 1319–1322 (1994)]. Diese schockierende Tatsache wurde auf den Mangel an langkettigen, ungesättigten Fettsäuren, wie etwa DHA und Arachidonsäure in Milchpulver für Kleinkinder zurückgeführt, während diese Säuren in Muttermilch vorhanden waren, wobei diese Säuren eine wichtige Rolle in der Hirnentwicklung spielen können. Viele Studien wurden unternommen, um Milchpulver für Kleinkinder so ähnlich wie möglich der Muttermilch zu machen, der idealen Ernährung für Kinder, obwohl diese Studien sich auf die Aufklärung der Beziehung zwischen den Grundnahrungsstoffen, Vitaminen, Mineralien usw. konzentrierten, die in der Muttermilch vorhanden waren, und auf die Infektionen verhinderte Wirkung der Muttermilch. Später wurde der Einfluss von langkettigen, vielfach ungesättigten Fettsäuren auf das Hirn ebenfalls interessant. Außerdem wurden jüngst nacheinander Berichte veröffentlicht, die zeigten, dass langkettige, ungesättigte Fettsäuren eine Rolle bei der Entwicklung, des Hirns und der Retina von Neugeborenen spielen können. Diese auftretenden Gesprächsthemen lenkten Aufmerksamkeit auf das Gebiet der Ernährung von Kleinkindern und Neugeborenen. Folglich war es erwünscht, ein Öl zu entwickeln, das reichlich Arachidonsäure enthält und sicher als ein Bestandteil von Lebensmitteln, insbesondere von Formulierungen für Kleinkinder, verwendbar ist.

**[0004]** Arachidonsäure tritt weit verbreitet im Tierreich auf, und es wurde aus Lipiden bzw. Fetten isoliert, die aus der Nebenniere und der Leber von Tieren extrahiert wurden. Weil jedoch derartige Organe die Säure nur sehr wenig enthalten und eine größere Menge der Organe nur schwerlich erhältlich ist, ist die Isolation aus diesen Organen ungenügend für die Zufuhr von Arachidonsäure. Es wurden Verfahren vorgeschlagen, um Arachidonsäure durch Kultivierung von verschiedenen Mikroorganismen herzustellen, die Arachidonsäure produzieren können. Von denen waren die, die zu der Gattung *Mortierella* gehören, dafür bekannt, Öl mit einem hohen Gehalt an Arachidonsäure zu produzieren (japanische veröffentlichte ungeprüfte Patentanmeldung Nr.: 44891/88 und Nr.: 12290/88). Obwohl von dem auf diese Weise produzierten Öl gesagt wurde, dass es sehr sicher ist, wurde es nicht weithin akzeptiert, weil es aus Mikroorganismen stammt. Das durch Kultivierung der zu der Art *Mortierella alpina* gehörenden Mikroorganismen erhaltene Öl umfasst hauptsächlich Triglyceride (etwa 70 Gew.-% oder mehr) und Phospholipide, zusammen mit nicht verseifbaren Stoffen einschließlich Desmosterol. Es ist bestätigt, dass Sterin (Sterol) mit einer Cyclopropanstruktur, von welcher nie bekannt war, dass sie in der Natur auftritt, konkret 24,25-Methylencholest-5-en-3 $\beta$ -ol, in den nicht verseifbaren Stoffen enthalten ist [LIPIDS, Bd. 27, Nr. 6, 481–483 (1992)], obwohl die gesamte Zusammensetzung der nicht verseifbaren Stoffe in dem Öl nicht bekannt ist.

**[0005]** WO 94/28913 ist auf pharmazeutische Zusammensetzungen gerichtet, die unter anderem Arachidonsäure enthalten. In diesem Dokument wird die Herstellung eines ungereinigten Öls mit 45% Arachidonsäure aus einer Kultur von *Mortierella alpina* beschrieben.

**[0006]** In EP-A-0 726 321 (entspricht JP-A-8214893) wird ein Verfahren für die Herstellung eines Öls mit bis zu 41% Arachidonsäure aus *Mortierella* sect. *Schmuckeri* beschrieben.

**[0007]** WO 92/13086 (entspricht JP-T-6505384) offenbart Verfahren für die Herstellung von Arachidonsäure aus verschiedenen Pilzarten, bevorzugt *Pythium insidiosum*.

**[0008]** NEW FOOD INDUSTRY, Band 37, Nr. 9, Kengo, A. und Shimizu, A. ist auf die Herstellung von Arachidonsäure enthaltenden Ölen und Fetten, gerichtet durch einen Stamm von *Mortierella alpina* 1S-4 hergestellt werden.

**[0009]** EP-A-0 276 541 (entspricht JP-A-63044891) und EP-A-0 223 960 (entspricht JP-A-63012290) sind auf Verfahren für die Herstellung von Arachidonsäure und Arachidonsäure enthaltenden Lipiden aus *Mortierella* spec. gerichtet.

#### OFFENBARUNG DER ERFINDUNG

**[0010]** Die Erfinder halten es zur Zeit für wünschenswert, aus dem Arachidonsäure enthaltenen Öl, das durch Kultivierung von Mikroorganismen erhalten wird, die zu der Untergattung *Mortierella* der Gattung *Mortierella* gehören, soweit wie möglich die Substanzen zu entfernen, welche nicht als Lebensmittelbestandteile anerkannt sind oder von welchen die Strukturen unbekannt verbleiben. Daher beabsichtigt diese Erfindung ein essbares Öl zur Verfügung zu stellen, das Arachidonsäure enthält, das aus Mikroorganismen stammt, die zu der Untergattung *Mortierella* der Gattung *Mortierella* gehören, die wenig nicht verseifbare Stoffe enthalten und vor allem die geringst mögliche Menge des Sterols mit einer Cyclopropanstruktur, welches nie gegessen wurde, enthalten, und das für die Herstellung von Lebensmitteln, insbesondere für Formulierungen für Kleinkinder (Kinderformulierungen), geeignet ist.

**[0011]** Die Erfinder haben gefunden, dass es möglich ist, den Gehalt an 24,25-Methylencholest-5-en-3 $\beta$ -ol in dem Arachidonsäure enthaltenden Öl, das aus der Kultivierung von Arachidonsäure produzierenden Mikroorganismen erhalten wird, die zu der Gattung *Mortierella* gehören, durch Steuerung der Kultivierungsbedingungen zu verringern. Diese Erkenntnis gab den Erfindern ein neues Ziel der Herstellung von Arachidonsäure enthaltendem Öl mit einer geringst möglichen Menge an Substanzen, welche nicht als Lebensmittelbestandteile anerkannt sind, oder von welchen die Strukturen unbekannt verbleiben. Dann haben die Erfinder als das Ergebnis vieler Untersuchungen zur Erreichung des obigen Ziels gefunden, dass es möglich ist, den Gehalt an nicht verseifbaren Stoffen und den Substanzen, die Sterol mit Cyclopropanstrukturen enthalten, welche nicht als Lebensmittelbestandteile anerkannt sind, oder welche unbekannt verbleibende Strukturen haben, ohne einen Einfluss auf den Gehalt an Arachidonsäure zu reduzieren durch Kultivieren von Arachidonsäure produzierenden Mikroorganismen, die zu der Untergattung *Mortierella* der Gattung *Mortierella* gehören, in einem Nährstoffmedium gemäß dem herkömmlichen Verfahren, Sammeln der Mikroben, Gewinnen des an Arachidonsäure reichen Öls aus den Mikroben und Raffinieren des Öls durch eine geeignete Kombination von herkömmlichen Verfahren für essbare Öle und Fette, wie etwa Degummieren, Behandlung mit Lauge, Bleichen, Desodorieren (Geruchsentfernen) usw. Letzten Endes vervollständigten die Erfinder diese Erfindung.

**[0012]** Diese Erfindung bezieht sich auf Arachidonsäure enthaltendes essbares Öl, das aus Mikroorganismen stammt, welches nicht mehr als 0,8 Gew.-%, bevorzugt nicht mehr als 0,6 Gew.-%, nicht verseifbarer Stoffe, 30 Gew.-% oder mehr Arachidonsäure und nicht mehr als 0,3 Gew.-%, bevorzugt nicht mehr als 0,15 Gew.-%, 24,25-Methylencholest-5-en-3 $\beta$ -ol enthält.

**[0013]** Außerdem bezieht sich diese Erfindung auf Lebensmittel, wie etwa Formulierungen für Frühgeborene (Frühchen), Formulierungen für Kleinkinder, Lebensmittel für Kleinkinder und Lebensmittel für schwangere Frauen und stillende Mütter, die gemäß Anspruch 6 beziehungsweise 7 definiert sind, die das vorher erwähnte essbare Öl enthalten, und die Verwendung des Arachidonsäure enthaltenden, essbaren Öls als ein Inhaltsstoff in Lebensmitteln oder Formulierungen.

**[0014]** Das Öl dieser Erfindung ist ein Öl, das aus Mikroorganismen stammt, die aus der Kultur nach Kultivierung von Arachidonsäure produzierenden Mikroorganismen, die zu der Untergattung *Mortierella* der Gattung *Mortierella* gehören, erhalten wird, das nicht mehr als 0,8 Gew.-%, bevorzugt nicht mehr als 0,6 Gew.-%, bevorzugter nicht mehr als 0,5 Gew.-% nicht verseifbarer Stoffe auf der Grundlage des Gewichts des Öls, und 30 Gew.-% oder mehr, bevorzugter 35 Gew.-% oder mehr, an Arachidonsäure auf der Grundlage des Gewichts der gesamten Fettsäuren in dem Öl enthalten.

**[0015]** Das erfindungsgemäße Öl enthält nicht mehr als 0,3 Gew.-%, bevorzugt nicht mehr als 0,15 Gew.-%, bevorzugter nicht mehr als 0,04 Gew.-% 24,25-Methylencholest-5-en-3 $\beta$ -ol. Es ist ebenfalls bevorzugt, dass das erfindungsgemäße Öl 70 Gew.-% oder mehr, bevorzugt 90 Gew.-% oder mehr, bevorzugter 92 Gew.-% oder mehr Triglyceride in dem Öl enthält.

**[0016]** Es ist bevorzugt, dass das erfindungsgemäße Öl nicht mehr als 0,1% Feuchtigkeit enthält, einen Säurewert von 0,5 oder weniger und einen Peroxidwert von 5 oder weniger hat, eine Farbe von 50 oder weniger Gelb und 10 oder weniger Rot, bestimmt in einer 133,4 mm Zelle durch das Povibond'sche Verfahren hat, und 0,2 bis 0,7% Myristinsäure, 10 bis 16% Palmitinsäure, 4 bis 10% Stearinsäure, 5 bis 15% Ölsäure, 5 bis 15% Linolsäure, 1 bis 5%  $\gamma$ -Linolensäure, 0,1 bis 2%  $\alpha$ -Linolensäure, 1 bis 6% Dihomo- $\gamma$ -Linolensäure, 0 bis 1% Eicosapentaensäure und 2 bis 7% Lignocerinsäure enthält.

**[0017]** Die für die Herstellung des erfindungsgemäßen Öls verwendeten Mikroorganismen gehören zu der Untergattung *Mortierella* der Gattung *Mortierella* und jedes davon kann verwendet werden, soweit sie in der Lage sind, Arachidonsäure zu produzieren. Beispiele der Mikroorganismen sind *Mortierella elongata* IFO 8570, *Mortierella exigua* IFO 8571, *Mortierella hygrophila* IFO 5941, *Mortierella alpina* IFO 8568, ATCC 16266, ATCC 32221, ATCC 42430, CBS 219.35, CBS 224.37, CBS 250.53, CBS 343.66, CBS 527.72, CBS 529.72, CBS 528.72, CBS 608.70, CBS 754.68, usw. Diese Stämme sind ohne eine Beschränkung von dem Foundation Institute of Fermentation in Osaka (IFO), der American Type Culture Collection (ATCC) und dem Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) erhältlich. Ebenfalls kann der von den Erfindern aus dem Boden isolierte Stamm *Mortierella elongata* SAM 0219 [National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry, 1-3, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaragi-ken, Japan, hinterlegt am 19. März 1986, Zugang Nr. FERM BP-1239] verwendet werden. Die Stämme, die zu diesen Typkulturen gehören oder aus der natürlichen Umgebung isoliert wurden, sind verwendbar wie sie sind, und spontane Varianten können verwendet werden, welche durch eine oder mehrere Wiederholungen von Wachstum und/oder Isolierung der Ursprungsstämme erhalten werden und von denen der Originalstämme unterschiedliche Eigenschaften haben.

**[0018]** Die in dieser Erfindung verwendeten Mikroorganismen schließen ebenfalls die Varianten und Rekombinanten der Arachidonsäure produzierenden Mikroorganismen ein, die zu der Untergattung *Mortierella* der Gattung *Mortierella* (Wildstämme) gehören, d. h. diese, die so geartet sind, dass der Gehalt an Arachidonsäure in dem Öl erhöht sein kann und/oder der Gehalt des Gesamtöls erhöht sein kann, verglichen mit dem durch Mikroorganismen des ursprünglichen Wildstamms produzierten, wenn sie unter Verwendung der gleichen Substrate kultiviert werden. Die Mikroorganismen dieser Erfindung schließen ferner die ein, die so geartet sind, dass sie effizient die Substrate mit guten Kosten-Nutzen-Verhältnissen nutzen können, um soviel wie möglich Arachidonsäure, verglichen zu den entsprechenden Wildstämmen, zu produzieren.

**[0019]** Mikroorganismen, die Arachidonsäure produzieren können, können gemäß dem herkömmlichen Verfahren kultiviert werden. Zum Beispiel wird die Spore, das Mycel, oder die Vorkultur, erhalten durch vorbereitende Kultivierung des Mikroorganismusstamms, in eine übliche Flüssigkeit oder ein festes Medium geimpft, gefolgt durch Kultivierung. Wenn ein flüssiges Medium verwendet wird, schließen übliche Kohlenstoffquellen Glucose, Fructose, Xylose, Saccharose, Maltose, lösliche Stärke, Raffinerie-Melasse, Glycerol, Mannitol, Citronensäure ein, und Maisstärke kann verwendet werden, von welchen Glucose, Fructose, Maltose, Glycerol, Citronensäure und Maisstärke besonders bevorzugt sind. Verwendbare Stickstoffquellen sind organische Stickstoffquellen, wie etwa Pepton, Hefeextrakt, Malzextrakt, Fleischextrakt, Casamino-säuren, Maisquellwasser und Harnstoff, und anorganische Stickstoffquellen, wie etwa Natriumnitrat, Ammoniumnitrat, und Ammoniumsulfat.

**[0020]** Die Verwendung einer aus Sojabohnen stammenden Nährstoffquelle als die Stickstoffquelle kann den Gehalt an 24,25-Methylencholest-5-en-3 $\beta$ -ol in dem Öl (das Verhältnis auf der Grundlage des Gesamtsterols in dem Öl) verringern. Es ist bevorzugt, dass die Stickstoffquelle, die aus Sojabohnen erhalten wird, die in dieser Erfindung verwendbar ist, 2% oder mehr, bevorzugt 3% oder mehr, bevorzugter 5% oder mehr Stickstoff auf der Grundlage der Inhaltsstoffe, die unterschiedlich zur Feuchtigkeit sind, enthält. Verwendbare Stickstoffquellen aus Sojabohnen enthalten entfettete Sojabohnen ohne weitere Behandlung oder nach Verarbeitung, wie etwa eine Wärmebehandlung; eine Säurebehandlung; eine Laugebehandlung; eine Enzymbehandlung; eine chemische Modifizierung; eine Denaturierung und/oder Renaturierung durch chemische und/oder physikalische Behandlungen einschließlich Wärmebehandlung, Säurebehandlung, Laugebehandlung, Enzymbehandlung, chemischer Modifikation usw.; Entfernung einiger Inhaltsstoffe durch Verwendung von Wasser und/oder von organischen Lösungsmitteln; Entfernung von einigen Inhaltsstoffen durch Filtration und/oder Zentrifugation; Einfrieren; Pulverisieren; Trocknen; Sieben; usw., oder nicht entfettete Sojabohnen nach ähnlicher

Verarbeitung. Diese Stickstoffquellen können alleine oder in Kombination von einigen von ihnen verwendet werden. Gewöhnliche Quellen sind Sojabohnen, entfettete Sojabohnen, Sojabohnenflocken, Sojabohnenprotein für Lebensmittel, Tofuabfall, Sojamilch, geröstete und gemahlene Sojabohnen usw., von welchen wärmedenaturierte, entfettete Sojabohnen erwünscht sind, und es ist erwünschter, entfettete Sojabohnen nach Wärmedenaturierung gefolgt durch Entfernen von in Ethanol löslichen Inhaltsstoffen zu verwenden.

**[0021]** Zusätzlich können ggf. anorganische Salze, wie etwa Phosphate, Calciumchlorid, Magnesiumchlorid, Magnesiumsulfat, Eisensulfat, Kupfersulfat und Natriumsulfat und Vitamine als Spurennährstoffe verwendet werden. Diese Nährstoffe in dem Medium sind nicht besonders beschränkt, solange jedes von ihnen in einer derartigen Konzentration enthalten ist, dass es nicht das Wachstum des Mikroorganismus hemmt. Für praktische Zwecke ist die bevorzugte Konzentration der Kohlenstoffquelle 0,1 bis 30 Gew.-%, bevorzugt 0,5 bis 15 Gew.-%, bevorzugt 1 bis 15 Gew.-%, während die bevorzugte Konzentration der Stickstoffquelle 0,01 bis 10 Gew.-%, bevorzugt 0,1 bis 5 Gew.-% ist. Eine Spinnerkultur mit Belüftung und Bewegung, eine Schüttelkultur oder eine Standkultur wird bei Temperaturen von 5 bis 40°C, bevorzugt 20 bis 30°C in einem Medium mit pH 4 bis 10, bevorzugt 5 bis 8, gewöhnlich für 2 bis 20 Tage durchgeführt.

**[0022]** Falls ein festes Medium verwendet wird, wird Weizenkleie, Hülsenstreu, Reiskleie oder ähnliches, zu welchen 50 bis 100 Gew.-% Wasser zugegeben wird, für die Bebrütung bei Temperaturen von 5 bis 40°C, bevorzugt 20 bis 30°C, für 3 bis 20 Tage verwendet. Stickstoffquellen, anorganische Salze und/oder Spurennährstoffe können wie erforderlich zu dem Medium hinzugegeben werden.

**[0023]** Für die Erhöhung der produzierten Arachidonsäuremenge kann ein Kohlenwasserstoff wie etwa Hexadekan oder Oktadekan; eine Fettsäure, wie etwa Oleinsäure oder Linolsäure, oder ein Salz davon, wie etwa das Natrium oder das Kaliumsalz, oder ein Fettsäureester, wie etwa ein Ethylester, ein Sorbitolfettsäureester, ein Glycerolfettsäureester; oder Öle und Fette, wie etwa Olivenöl, Baumwollsamensöl, Kokosnussöl alleine oder in Kombination als ein Vorläufer von Arachidonsäure hinzugegeben werden. Diese Zusatzstoffe können zu einem Zeitpunkt oder kontinuierlich oder mehrmals partienweise zugegeben werden. Kohlenwasserstoffe, Fettsäuren, oder die Salze davon, oder Öle und Fette sind wünschenswert, wenn sie vor dem Beginn der Kultivierung hinzugegeben werden, während Fettsäuren, und Salze davon, oder Fettsäureester oder Öle und Fette wünschenswert sind, wenn sie während der Kultivierung zugegeben werden.

**[0024]** Nach Kultivierung unter den vorher erwähnten Bedingungen, wird das Arachidonsäure enthaltende Lipid in den Mikroben produziert und akkumuliert. Wenn ein flüssiges Kulturmedium verwendet wird., wird das Arachidonsäure enthaltende Lipid aus den Mikroben wie folgt gewonnen:

Nachdem die Kultivierung abgeschlossen ist, werden die Mikroben aus dem Kulturmedium durch herkömmliche Feststoff-Flüssigkeitsseparationsmittel, wie etwa Zentrifugation und/oder Filtration usw. gesammelt. Die auf diese Weise gesammelten Mikroben werden bevorzugt mit Wasser gewaschen, zerstört und getrocknet. Die Mikroben werden durch Gefriertrocknen, Trocknen an der Luft usw. getrocknet. Die getrockneten Mikroben werden einer Extraktion mit einem organischen Lösungsmittel, bevorzugt unter Stickstofffluss, unterzogen. Verwendbare organische Lösungsmittel schließen Ether, Hexan, Methanol, Ethanol, Chloroform, Dichlormethan, Petrolether usw. ein. Abwechselnde Extraktion mit Methanol und Petrolether und Extraktion mit einem Einschicht-Lösungsmittelsystem, das aus Chloroform, Methanol und Wasser besteht, sind ebenfalls in der Lage, ein gutes Ergebnis zu erzielen. Das Verdampfen des organischen Lösungsmittels aus dem Extrakt unter reduziertem Druck ergibt ein Öl, das Arachidonsäure in einer hohen Konzentration enthält.

**[0025]** Anstelle der vorher erwähnten Verfahren können feuchte Mikroben für die Extraktion verwendet werden. In diesem Fall verwendbare Lösungsmittel schließen die ein, die in Wasser löslich sind, wie etwa Methanol, Ethanol und ähnliche, und wasserlösliche Mischungen, die diese Lösungsmittel und Wasser und/oder andere Lösungsmittel enthalten. Das weitere Vorgehen ist das gleiche wie vorher erwähnt.

**[0026]** Das auf diese Weise erhaltene Arachidonsäure enthaltende Lipid enthält hauptsächlich Triglyceride (etwa 70 Gew.-% oder mehr) und Phospholipide (nicht mehr als etwa 30 Gew.-%) und, zusätzlich, nicht verseifbare Stoffe einschließlich Desmosterol bzw. Desmosterin. Die nicht verseifbaren Stoffe enthalten Substanzen von denen die Strukturen unbekannt verbleiben oder welche nicht als Lebensmittelbestandteile anerkannt sind, z. B. Sterol mit Cyclopropanstruktur, welches nicht als ein Lebensmittelbestandteil anerkannt ist, spezifisch 24,25-Methylencholest-5-en-3 $\beta$ -ol.

**[0027]** Das erfindungsgemäße Öl kann durch Raffinieren des Arachidonsäure enthaltenden Öls, das durch Kultivierung der vorher erwähnten Arachidonsäure produzierenden Mikroorganismen erhalten wird, die zu der Untergattung Mortierella gehören, produziert werden. Das heißt, wenn einmal die Art des zu behandelnden

Fetts und die zu entfernenden Substanzen bestimmt wurden, können die nicht verseifbaren Stoffe, die Sterol mit Cyclopropanstruktur und Substanzen enthalten, deren Struktur unbekannt verbleibt, mit einer geeigneten Kombination von herkömmlichen Verfahren für die Raffinierung von essbaren Ölen und Fetten wie etwa Degummieren, Raffinieren mit Alkali, Bleichen, Desodorieren usw., ohne einen Einfluss auf den Gehalt an Arachidonsäure aus dem Arachidonsäure enthaltenden Öl, erhalten durch Kultivierung der vorher erwähnten Mikroorganismen, die zu der Gattung *Mortierella* gehören und Arachidonsäure reduzieren können, entfernt werden.

**[0028]** Für die Raffination wird in dieser Erfindung die Säulenchromatographie eingesetzt. Aktiviertes Aluminiumoxid, Aktivkohle, Molekularsiebe, Silicagel, aktivierter Ton, Kieselgur, Silber-Silicagel und/oder Ionenaustauschharze werden in dieser Erfindung verwendet. Das vorher erwähnte Arachidonsäure enthaltende Öl wird unter Verwendung des Gels als das Packungsmaterial raffiniert. Das vorher erwähnte Arachidonsäure enthaltende Öl und ein organisches Lösungsmittel, wie etwa Hexan, Ethanol, eine überkritische Flüssigkeit usw., welches als ein Entwickler verwendet wird, werden dazu getrieben langsam oder als eine Mischung davon bei einer konstanten Geschwindigkeit durch die mit dem Gel gepackte Säule zu fließen, sodass nicht verseifbare Stoffe und das raffinierte Öl entwickelt und eluiert werden können. Die Chromatographie kann durch die Simulated-Moving-Bed-Chromatographie durchgeführt werden.

**[0029]** Nach Entfernen des organischen Lösungsmittels durch Destillation usw. wird der Rückstand weiter durch Dampfdestillation behandelt. Die Dampfdestillation kann nämlich selbst Spuren flüchtiger Geschmacksbestandteile und nicht verseifbarer Stoffe mit niedrigen Siedepunkten entfernen. Ebenfalls kann zur gleichen Zeit eine Spurenmenge des verbleibenden organischen Lösungsmittels, das nach dem chromatographischen Prozess zurückgeblieben ist, eliminiert werden. Folglich wird eine essbare Ölzusammensetzung, die Arachidonsäure enthält und im Wesentlichen frei von nicht verseifbaren Stoffen ist, erhalten. Die Säulenchromatographie kann mit anderen gut bekannten Verfahren für die Raffinierung zusätzlich zu der Dampfdestillation oder fraktionierten Destillation mit einer überkritischen Flüssigkeit kombiniert werden.

**[0030]** Aufgrund des geringen Gehalts an 24,25-Methylencholest-5-en-3 $\beta$ -ol, das nicht als ein Lebensmittelbestandteil anerkannt ist, kann das Arachidonsäure enthaltende Öl dieser Erfindung als ein Inhaltsstoff von Lebensmitteln verwendet werden. Die Art des Lebensmittels ist nicht besonders beschränkt, beispielhaft sind Lebensmittel, die Öle und Fette enthalten, einschließlich natürlicher Lebensmittel, die Öle und Fette enthalten, wie etwa Fleisch, Fisch und Nüsse; Lebensmittel, zu welchen Öle und Fette während des Kochens gegeben werden, wie etwa chinesische Gerichte, chinesische Nudeln, Suppe usw.; Lebensmittel, welche Öle und Fette als das Wärmetransfermedium verwenden, wie etwa Tempura, Gebratener, frittierte Tofu, ein chinesisches Gericht mit frittiertem Reis, Donuts (Pfannkuchen), frittierte Teigkuchen usw.; fettige Lebensmittel und verarbeitete Lebensmittel mit während der Verarbeitung zugesetzten Fetten und Ölen, wie etwa Butter, Margarine, Mayonnaise, Dressing, Schokolade, chinesische Instantnudeln, Karamell, Biskuit, Eiskrem usw.; und Lebensmittel mit aufgesprühten oder während der Fertigstellung aufgetragenen Ölen und Fetten, wie etwa frittierte Reistaschen, Hartbiskuit, Bohnenmusbrötchen („bean jam bun“) usw. Jedoch sind die Lebensmittel nicht auf die beschränkt, die Öle und Fette enthalten, sondern es können landwirtschaftliche Lebensmittel, wie etwa Brot, Nudeln, Reis, Süßwaren, Tofu und verarbeiteter Tofu, fermentierte Lebensmittel, wie etwa Sake, medizinischer Sake, süßer Sake (Mirin), Essig, Miso, Dressing usw.; tierische Lebensmittel, wie etwa Joghurt, Schinken, Speck, Würste, Mayonnaise usw.; Fischlebensmittel wie etwa Fischpaste, frittierte Fischpaste, Fischpaste die zerriebene Yamswurzel enthält; Getränke, wie etwa Fruchtsaft, Erfrischungsgetränke, Sportgetränke, alkoholische Getränke, Tee usw. enthalten sein.

**[0031]** Die Öle dieser Erfindung sind bevorzugt als Rohmaterialien insbesondere für Formulierungen für Frühchen, Formulierungen für Kleinkinder, Lebensmittel für Kleinkinder und Lebensmittel für schwangere Frauen und stillende Mütter, weil die Öle einen geringen Gehalt an 24,25-Methylencholest-5-en-3 $\beta$ -ol enthalten, welches nicht als ein Lebensmittelbestandteil anerkannt ist, reich an Arachidonsäure in der Form eines Triglycerids sind und frei von Eicosapentaensäure sind oder, wenn schon, nur Spurenmengen der Säure enthalten.

**[0032]** Außerdem kann das Öl dieser Erfindung in funktionellen Lebensmitteln einschließlich Gesundheitslebensmitteln für eine spezifizierte Verwendung (oder Gesundheitslebensmittel) verwendet werden und die Formen dieser Lebensmittel können allgemeine sein oder Kapseln, Körner, Tabletten, Getränke oder Formeln für die Zufuhr über den Darm sein.

#### BESTE AUSFÜHRUNGSFORM DER ERFINDUNG

**[0033]** Diese Erfindung wird nun ausführlicher mit Bezugnahme auf die folgenden Beispiele erläutert. Es sollte bemerkt werden, dass diese Erfindung überhaupt nicht durch diese Beispiele beschränkt wird.

## Erfindungsbeispiel 1

**[0034]** *Mortierella alpina* CBS754.68 als der Arachidonsäure erzeugende Mikroorganismus wurde in einen 2000-l-Kulturgefäß mit 1400 l Kulturmedium beimpft, das 2% Glukose, 1% Hefeextrakt und 0,2% Sojabohnenöl enthält, und die Kultur mit Belüften und Rühren wurde bei 28°C mit einer Belüftung von 1,0 vvm, einer Rührgeschwindigkeit von 80 U/Min. und einem Innendruck des Gefäßes von 1,0 kg/cm<sup>2</sup>G angefahren. Die Konzentration an Glucose wurde auf 1,5% durch das Fed-Batch-System gehalten und die Mikroben wurden durch Filtration nach 7-tägiger Kultivierung geerntet, um 25 kg getrockneter Mikroben zu ergeben. Dann wurde 5 l Hexan zu 1 kg der auf diese Weise erhaltenen Mikroben gegeben, und die Mischung wurde sacht für 30 Minuten gerührt. Danach wurde das durch Saugfiltration erhaltene Filtrat einem Verdampfen in einem Rotationsverdampfer unterzogen, um das Lösungsmittel zu entfernen, um 590 g eines roten Ölextrakts zu erhalten. Eine offene Säule wurde mit 450 g Silicagel gepackt. Der rohe Ölextrakt, 590 g, wurde fünffach mit Hexan verdünnt und durch die Säule raffiniert, gefolgt durch Verdampfen des Hexans, um 450 g eines säulenbehandelten Öls zu erhalten. Das Öl wurde weiterhin einer Dampfdestillation für die Desodorierung bzw. Geruchsbefreiung unterzogen, gefolgt durch Zugabe von 0,04% Tocopherol als ein Antioxiationsmittel, um ein raffiniertes Öl zu ergeben.

## Vergleichsbeispiel 1

**[0035]** Die Extraktion wurde in der gleichen Art und Weise wie in Beispiel 1 beschrieben durchgeführt, aber der Extrakt wurde nicht mit der Säule gefolgt durch Dampfdestillation für die Desodorierung behandelt, um ein raffiniertes Öl nach Zugabe von 0,04% Tocopherol zu erhalten.

## [Quantifizierung der nicht verseifbaren Stoffe]

**[0036]** Das im Erfindungsbeispiel 1 erhaltene raffinierte Öl und das in Vergleichsbeispiel 1 erhaltene wurden jeweils auf den Gehalt an nicht verseifbaren Stoffen durch das folgende Verfahren analysiert. Die Ergebnisse werden in der Tabelle 1 gezeigt. In dieser Erfindung meint der Gehalt an nicht verseifbaren Stoffen die Restmenge nach Subtraktion der Menge der kontaminierten Fettsäuren von der Menge der mit einem in der quantitativen Analyse verwendeten Lösungsmittel extrahierten Substanz nach Verseifen des Öls gemäß dem Verfahren der Quantifizierung von nicht verseifbaren Stoffen, welches in den Standardverfahren für die Analyse von Fetten, ölen und verwandten Materialien durch die japanische Ölchemiegesellschaft (Standard Methods for the Analysis of Fats, Oils and Related Material by Japan Oil Chemists' Society) festgelegt ist, die Restmenge wird als der Prozentsatz der Menge der Probe ausgedrückt. Die Menge der nach der Raffinierung zugesetzten nicht verseifbaren Stoffe, wie etwa Tocopherol, sollte abgezogen werden. Das vorher angegebene Verfahren wird im Folgenden erläutert (siehe „YUKAGKU (Oil chemistry)“, Journal of Japan Oil Chemists' Society, 13, 489 (1996)):

Wiege etwa 5 g einer Probe in einem Kolben ein, gebe 50 ml 1 N ethanolisches Calciumhydroxid dazu, und koche sacht für 1 Stunde zur Verseifung. Stoppe das Erwärmen, wenn die Verseifung vollständig ist, transferiere die Flüssigkeit nach Verseifen in einen Scheidetrichter zusammen mit Waschen des Verseifungskolbens mit 100 ml warmen Wasser, gebe 50 ml Wasser zu und lasse die Flüssigkeit auf Raumtemperatur abkühlen. Gebe 100 ml Ethylether zu dem Scheidetrichter während der Verseifungskolben mit Ethylether gewaschen wird, verstopfe dicht den Trichter, schüttele stark für 1 Minute, und lass es stehen, bis sich zwei Schichten klar abgetrennt haben. Transferiere die untere Schicht in einen zweiten Scheidetrichter und gebe 50 ml Ethylether zu, schüttele wie bei dem ersten Trichter und lass es stehen, transferiere die untere Schicht in einen dritten Trichter nach Auftrennung in zwei Schichten und wiederhole die Extraktion mit 50 ml Ethylether.

**[0037]** Transferiere die Ethyletherschichten in den zweiten und dritten Trichtern in den ersten Trichter während diese Trichter mit einer geringen Menge Ethylether gewaschen werden, gebe 30 ml Wasser zu, schüttele und lass es dann stehen für die Auftrennung in zwei Schichten und entferne die untere Schicht. Wiederhole den Vorgang des Schüttelns und Stehenlassens für die Fraktionierung mit 30 ml Wasser Zugabe jeweils, und wasche den Extrakt bis das fraktionierte Wasser nicht mehr die Farbe des Phenolphthaleinindikators zeigt. Dehydriere den gewaschenen Ethyletherextrakt mit Natriumsulfat (wasserfrei) wie erforderlich, filtriere ihn durch ein trockenes Filterpapier, transferiere das Filtrat in einen Destillationskolben. Die Behälter, das Filterpapier usw., die für die Extraktion verwendet werden, werden jeweils mit einer geringen Menge Ethylether gewaschen, und die Waschungen werden alle in den Destillationskolben gegeben. Entferne den Ethylether in dem Destillationskolben durch Destillation, Abkühlen, wenn das Volumen etwa 50 ml erreicht und transferiere den konzentrierten Ethyletherextrakt in einen exakt ausgewogenen 100-ml Rundbodenkolben zusammen mit der Waschung des Destillationskolbens mit einer geringen Menge Ethylether.

**[0038]** Destilliere nahezu den vollständigen Ethylether in dem Rundbodenkolben ab, gebe 3 ml Aceton zu, wobei das meiste davon ähnlich wie in dem vorhergehenden Verfahren abdestilliert wird, erwärme den Extrakt auf 70 bis 80°C für 30 Minuten unter leicht reduziertem Druck (etwa 200 mmHg), ordne den Rundbodenkolben in einen Vakuumdesikkator an, und lasse es für 30 Minuten zum Abkühlen stehen. Wiege genau den Rundbodenkolben, um das Gewicht des Extrakts zu berechnen.

**[0039]** Gebe zu und mische durch Schütteln 2 ml Ethylether und 10 ml neutrales Ethanol in den Rundbodenkolben, um den Extrakt zu lösen und um die Menge der kontaminierten Fettsäuren durch Titration mit der N/10 ethanolischen Calciumhydroxid Standardlösung und Verwendung des Phenolphthaleinindikators zu bestimmen, wobei der Endpunkt die 30 Sekunden unveränderte blasse rote Farbe des Indikators ist.

Gehalt an nicht verseifbaren Stoffen (%) =  $\{A - (B \times F \times 0,0282)\} / C \times 100$

Kontaminierte Fettsäuren (auf der Ölsäurebasis, g) =  $B \times F \times 0,0282$

wobei

A = Gewicht des Extrakts (g)

B = Verwendete Menge der N/10 ethanolischen Kaliumhydroxid-Standardlösung (ml)

C = Menge der Proben (g)

F = Titer der N/10-ethanolischen Kaliumhydroxid-Standardlösung

[Quantifizierung der Arachidonsäure]

**[0040]** Die in dem Erfindungsbeispiel 1 und dem Vergleichsbeispiel 1 erhaltenen Ölpräparationen wurden für die Herstellung von Fettsäuremethylestern gemäß dem folgenden beschriebenen Verfahren verwendet, und die Ester wurden einer Gaschromatographie zur Bestimmung des Gehalts an Arachidonsäure unterzogen. Die Ergebnisse werden in der Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1

	Gehalt an nicht verseifbaren Stoffen (%)	* Schwermetalle	Gehalt an 24,25-Methylencholest-5-en-3 $\beta$ -ol (%)	Gehalt an Arachidonsäure (%)
Erfindungsbeispiel 1	0,5	Nicht nachgewiesen	0,26	38
Vergleichsbeispiel 1	1	Nicht nachgewiesen	0,51	39
* Nachweisgrenze 0,5 ppm				

#### Herstellung von Methylestern

**[0041]** 15 mg der Probe wurden genau gewogen und in Methylester durch Behandlung mit absoluter Methanol-Salzsäure (95:5) bei 50°C für 3 Stunden umgewandelt. Die resultierenden Fettsäuremethylester wurden vollständig mit Hexan extrahiert und einer Gaschromatographie unter den folgenden Bedingungen unterzogen.

#### Säule

Flüssigphase: Advantec-DS 5%

Träger: Chromosorb W (AW-DMCS)

Korngröße: 80 bis 100 Maschen

Größe: Innerer Durchmesser 3 mm  $\times$  2,1 m

Trärgas: Stickstoff 60 mL/m

Detektor: FID

Säulentemperatur: 190°C

Detektortemperatur 250°C

Einspritzstellentemperatur: 240°C



[Quantifizierung von 24,25-Methylencholest-5-en-3 $\beta$ -ol]

**[0042]** Die in Erfindungsbeispiel 1 und Vergleichsbeispiel 1 erhaltenen raffinierten Ölpräparationen wurden einer Quantifizierung von 24,25-Methylencholest-5-en-3 $\beta$ -ol unterzogen. Die Ergebnisse werden in Tabelle 1 gezeigt. Zunächst wird das Verfahren der Sterolzusammensetzungsanalyse erläutert. Wiege 30 bis 80 mg des Ausgangsöls in ein Teströhrchen mit einem Verschluss ein, gebe 4 ml Methanol und 1 ml 33% wässrige Lösung von Kaliumhydroxid dazu und verschließe das Röhrchen mit dem Stopfen. Lasse die Mischung bei sachtem Rühren bei 80°C für 1 Stunde reagieren, lasse sie zum Kühlen stehen und extrahiere fettlösliche Bestandteile mit Hexan. Wasche die resultierende Hexanlösung mit Wasser bis die wässrige Lösung nicht mehr die Farbe mit dem Phenolphthaleinindikator zeigt, und konzentriere die Lösung unter reduzierten Druck, um eine Probe für die Analyse zu ergeben. Löse die Probe in einer geringen Menge Hexan und unterziehe die Lösung einer Gaschromatographie unter den im Folgenden beschriebenen Bedingungen. Verwende kommerziell erhältliches Cholesterol als interner Standard und berechne das Verhältnis des Gewichts zu dem des Ausgangsöls auf der Grundlage der Annahme, dass das Verhältnis der durch den FID nachgewiesenen Fläche/nachgewiesenen Gewicht das gleiche für alle Sterole ist. Das berechnete Verhältnis wird als der Gehalt an 24,25-Methylencholest-5-en-3 $\beta$ -ol definiert.

## Bedingungen der Gastchromatographie

Säule:	ULBON HR-1 (innerer Durchmesser 0,25 mm, Länge 25 m)
Säulentemperatur:	280°C
Einspritzstellen- und Detektortemperatur:	300°C
Trärgas und Überdruck:	Helium 1,2 kg/cm <sup>2</sup>
Make-Up-Gas (Spülgas) und Fließgeschwindigkeit:	Stickstoff 70 ml/min.
Detektor:	FID
Splitverhältnis:	20

## Erfindungsbeispiel 2

**[0043]** *Mortierella alpina* CBS527.72, *Mortierella alpina* ATCC42430, *Mortierella hygrophila* IFO5941 und *Mortierella elongata* IFO8570 wurden als Arachidonsäure erzeugende Mikroorganismen getrennt kultiviert. 600 Liter Kulturmedium, das 4 Glukose, 1% Hefeextrakt und 0,2% Sojabohnenöl enthielt, wurde in einen 1000-L-Gefäß gegeben und die Kultivierung erfolgte mit Belüften und Schütteln für 7 Tage bei 28°C mit einer Belüftung von 1,0 vvm, einer Schüttelgeschwindigkeit von 100 U/min und einem inneren Druck des Gefäßes von 0,5 kg/cm<sup>2</sup>G. Trockene Mikroben wurden nach Filtration und Trocknen erhalten.

**[0044]** Die auf diese Weise erhaltenen getrockneten Mikroben wurden in der gleichen Art und Weise wie in Erfindungsbeispiel 1 und Vergleichsbeispiel 1 beschrieben behandelt. Die resultierenden raffinierten Ölpräparationen wurden auf den Gehalt der nicht verseifbaren Stoffe, den Gehalt an 24,25-Methylencholest-5-en-3 $\beta$ -ol und den Gehalt an Arachidonsäure analysiert.

**[0045]** Die Ergebnisse werden in der Tabelle 2 gezeigt.

**[0046]** Es wurde gefunden, dass die Behandlung in einer Säule raffinierte Ölpräparation mit einem geringen Gehalt an 24,25-Methylencholest-5-en-3 $\beta$ -ol zeugen kann, während der Gehalt an Arachidonsäure unbeeinträchtigt blieb.

Tabelle 2

Stamm		Gehalt an nicht verseifbaren Stoffen (%)	Gehalt an 24,25-Methylencholest-5-en-3 $\beta$ -ol (%)	Gehalt an Arachidonsäure (%)
M.alpina CBS527.72	Erfindungsbeispiel	0,6	0,22	33
M.alpina CBS527.72	Vergleichsbeispiel	1,6	0,62	33

M.alpina ATCC42430	Referenzbeispiel	0,3	0,11	26
M.alpina ATCC42430	Vergleichsbeispiel	0,9	0,33	27
M.hygrophila IFO5941	Referenzbeispiel	0,5	0,15	23
M.hygrophila IFO5941	Vergleichsbeispiel	1,6	0,52	22
M.elongata IFO08570	Referenzbeispiel	0,4	0,23	21
M.elongata IFO08570	Vergleichsbeispiel	1	0,58	21

## Erfindungsbeispiel 3

**[0047]** Morierella alpina CBS754.68 als der Arachidonsäure produzierende Mikroorganismus wurde in einen 2000-L-Kulturgefäß mit 1400 l eines Kulturmediums beimpft, das 2% Glukose, 1% Hefeextrakt und 0,1% Sojabohnenöl enthält, und die Kultur wurde mit Belüften und Schütteln bei 24°C mit einer Belüftung von 0,5 vvm, einer Schüttelgeschwindigkeit von 100 U/min und einem inneren Druck des Gefäßes von 1,0 kg/cm<sup>2</sup>G angefahren. Die Konzentration an Glucose wurde durch ein Fed-Batch-System bei 1,5% gehalten und die Mikroben wurden durch Filtration nach 9-tägiger Kultivierung geerntet, um 20 kg getrocknete Mikroben zu ergeben. 15 Liter Hexan wurden zu 3 kg der auf diese Weise erhaltenen Mikroben gegeben und die Mischung wurde sacht für 30 Minuten gerührt. Dann wurde das durch Saugfiltration erhaltene Filtrat einer Verdampfung in einem Rotationsverdampfer unterzogen, um das Lösungsmittel zu entfernen, um 1800 g eines rohen Ölextrakts zu ergeben.

**[0048]** 1000 Gramm des rohen Ölextrakts wurden in einer Säule wie in Erfindungsbeispiel 1 beschrieben behandelt, um 900 g eines säulenbehandelten Öls zu ergeben. 500 Gramm des säulenbehandelten Öls und 800 g des rohen Ölextrakts wurden einer Destillation zur Entfernung von nicht verseifbaren Stoffen unterzogen.

**[0049]** Das säulenbehandelte Öl, das destillationsbehandelte Öl und das säulendestillationsbehandelte Öl wurden separat durch Dampfdestillation desodoriert und 0,04% Tocopherol wurde als ein Antioxidationsmittel zugegen. Die resultierende raffinierte Ölpräparation wurde auf dem Gehalt von nicht verseifbaren Stoffen, den Gehalt an 24,25-Methylencholest-5-en-3β-ol und den Gehalt an Arachidonsäure untersucht.

**[0050]** Die Ergebnisse werden in der Tabelle 3 gezeigt.

**[0051]** Es wurde bestätigt, dass die Säulebehandlung und/oder die Destillation raffinierte Ölpräparationen mit einem geringen Gehalt an 24,25-Methylencholest-5-en-3β-ol produzieren kann, während der Gehalt an Arachidonsäure unbeeinträchtigt blieb.

Tabelle 3

Behandlung	Gehalt an nicht verseifbaren Stoffen (%)	Gehalt an 24,25-Methylencholest-5-en-3β-ol (%)	Gehalt an Arachidonsäure (%)
Säulenbehandlung → Desodrierung	0,38	0,14	42
Destillation → Desodrierung	0,4	0,15	41
Säulenbehandlung → Destillation → Desodrierung	0,36	0,13	43

## Erfindungsbeispiel 4

**[0052]** Die Kultivierung erfolgte in der gleichen Art und Weise wie in Erfindungsbeispiel 1 und Vergleichsbeispiel 1 beschrieben, mit der Ausnahme, dass 1 Sojabohnenprotein (Marke: Esusan Meat, Ajinomoto Co., Inc.) an Stelle des Hefeextrakts verwendet wurde. Die erhaltenen Ölpräparationen wurden auf den Gehalt an nicht verseifbaren Stoffen, den Gehalt an 24,25-Methylencholest-5-en-3 $\beta$ -ol und den Gehalt an Arachidonsäure nach der gleichen Behandlung wie in Erfindungsbeispiel 1 und Vergleichsbeispiel 1 beschrieben analysiert. Die Ergebnisse werden in der Tabelle 4 gezeigt.

Tabelle 4

	Gehalt an nicht verseifbaren Stoffen (%)	Gehalt an 24,25-Methylencholest-5-en-3 $\beta$ -ol (%)	Gehalt an Arachidonsäure
Erfindungsbeispiel	0,5%	0,09%	37%
Vergleichsbeispiel	1,1%	0,20%	37%

## Beispiel 5

**[0053]** *Mortierella alpina* ATCC 32221 als der Arachidonsäure produzierende Mikroorganismus wurde in einen 50-l-Kulturgefäß zusammen mit 25 l eines Kulturmediums mit 4% Glukose, 1,2% entfetteten Sojabohnenpulver, 0,2% Kaliumhydrogenphosphat und 0,1% Sojabohnenöl gegeben und die Kultur mit Belüften und Schütteln erfolgte für 5 Tage bei 28°C mit Belüften bei 1,0 vvm, einer Schüttelgeschwindigkeit von 300 U/min und der innere Druck des Gefäßes war 1,0 kg/cm<sup>2</sup>G. Arachidonsäure enthaltende Mikroben wurden durch Filtration und Trocknen geerntet. Die auf diese Weise erhaltenen Mikroben wurden in der gleichen Art und Weise wie in Erfindungsbeispiel 1 und Vergleichsbeispiel 1 beschrieben behandelt, die resultierenden Ölpräparationen wurden auf den Gehalt von nicht verseifbaren Stoffen, den Gehalt an 24,25-Methylencholest-5-en-3 $\beta$ -ol und den Gehalt an Arachidonsäure analysiert. Die Ergebnisse werden in Tabelle 5 gezeigt.

Tabelle 5

	Gehalt an nicht verseifbaren Stoffen (%)	Gehalt an 24,25-Methylencholest-5-en-3 $\beta$ -ol (%)	Gehalt an Arachidonsäure (%)
Referenzbeispiel	0,5%	0,02%	25%
Vergleichsbeispiel	0,9%	0,05%	25%

## Patentansprüche

1. Arachidonsäure enthaltendes, essbares Öl, das aus Mikroorganismen stammt, welches nicht mehr als 0,8 Gew.-% nicht verseifbare Stoffe und 30 Gew.-% oder mehr Arachidonsäure enthält, und wobei der Gehalt an 24,25-Methylencholest-5-en-3 $\beta$ -ol nicht mehr als 0,3 Gew.-% ist.
2. Arachidonsäure enthaltendes, essbares Öl, das aus Mikroorganismen stammt, wie in Anspruch 1 beansprucht, wobei der Gehalt an nicht verseifbaren Stoffen nicht mehr als 0,6 Gew.-% ist.
3. Arachidonsäure enthaltendes, essbares Öl, das aus Mikroorganismen stammt, wie in Anspruch 1 oder 2 beansprucht, wobei der Gehalt an 24,25-Methylencholest-5-en-3 $\beta$ -ol nicht mehr als 0,15 Gew.-% ist.
4. Arachidonsäure enthaltendes, essbares Öl, das aus Mikroorganismen stammt, wie in einem der Ansprüche 1 bis 3 beansprucht, wobei die Mikroorganismen Mikroorganismen sind, die zu der Untergattung *Mortierella* der Gattung *Mortierella* gehören und in der Lage sind, Arachidonsäure zu produzieren.
5. Arachidonsäure enthaltendes, essbares Öl, das aus Mikroorganismen stammt, wie in Anspruch 4 beansprucht, wobei die zu der Untergattung *Mortierella* gehörenden Mikroorganismen diejenigen sind, die zu der Art *alpina* der Untergattung *Mortierella* gehören.
6. Lebensmittel, das ein Arachidonsäure enthaltendes, essbares Öl nach Anspruch 1 beinhaltet.

7. Formulierung für Frühchen, Kinderformulierung, Lebensmittel für Kinder, Lebensmittel für schwangere Frauen und stillende Mütter, die ein Arachidonsäure enthaltendes, essbares Öl nach Anspruch 1 beinhalten.

8. Verwendung des Arachidonsäure enthaltenden, essbaren Öls nach einem der Ansprüche 1 bis 5 als ein Inhaltsstoff in Lebensmitteln oder in Formulierungen für Frühchen oder in einer Kinderformulierung.

Es folgen keine Zeichnungen