

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 116 288**

⑤① Int. Cl.⁶: A23L 1/054, A23L 1/30
A61K 47/00, A23D 9/00
A23D 9/02, A23D 9/04
A23K 1/00, A23K 1/18
C12P 7/64, C12N 1/13
C12R 1/89, C11B 1/10
A23K 1/16

⑫

TRADUCCION DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **91903945.3**
⑧⑥ Fecha de presentación : **04.02.91**
⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **0 515 460**
⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **02.12.92**

⑤④ Título: **Acido docosahexanoico, procedimiento para su producción y compuestos que lo contienen.**

③⑩ Prioridad: **13.02.90 US 479135**

④⑤ Fecha de la publicación de la mención BOPI:
16.07.98

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de patente:
16.07.98

⑦③ Titular/es: **Martek Corporation**
6480 Dobbin Road
Columbia, MD 21045, US

⑦② Inventor/es: **Kyle, David John;**
Reeb, Sue, Ellen y
Sicotte, Valerie Jacqueline

⑦④ Agente: **Carpintero López, Francisco**

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 (artº 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCION

Antecedentes de la invención

Esta invención se refiere a un aceite unicelular comestible que contiene ácido docosahexanoico (DHA). La invención también se refiere a procedimientos para producir dicho aceite que contiene DHA con rendimientos comercialmente viables y a productos que contienen el aceite.

El DHA es un ácido graso omega-3 y es el ácido graso poliinsaturado (PUFA) de cadena larga más abundante en la materia gris del cerebro. Los ácidos grasos 3-omega en general se sabe que son beneficiosos para reducir la incidencia de la enfermedad coronaria [Lands, *Fish and Human Health* (1986) Academic Press]. Sin embargo, el metabolismo de los ácidos grasos 3-omega no se entiende bien. Por lo tanto, las dosificaciones clínicas exactas y la eficacia siguen siendo desconocidas.

Los peces marinos de agua fría son una fuente conocida de ácidos grasos 3-omega, incluyendo el DHA. La patente U.S. n° 4.670.285 describe el uso de aceite de pescado procedente de peces tales como *Brevoortia tyrannus* y arenque como fuente de ácidos grasos omega-3 C₂₂. En efecto, los aceites de pescado son la fuente comercial principal de ácidos grasos omega-3. Sin embargo, a menudo los aceites de pescado no se pueden usar para el consumo humano debido a la contaminación con contaminantes medioambientales tales como los PCB.

También hay problemas asociados con la recuperación de los aceites de pescado que contienen DHA para usos en alimentos. Dichos aceites a menudo huelen a pescado y tienen sabores desagradables asociados con los productos de oxidación de los ácidos grasos. Estos sabores y las toxicidades de los peróxidos hacen que los aceites no sean satisfactorios para usar en composiciones comestibles tales como alimentos infantiles y preparados para lactantes.

También se sabe que los microorganismos marinos contienen DHA. En particular, se sabe que diferentes especies de dinoflagelados contienen DHA. Harrington y col. en "The Polyunsaturated Fatty Acids of Marine Dinoflagellates" *J. Protozoal*, 17:213-219 (1970), caracteriza el contenido de ácidos grasos de ocho dinoflagelados marinos fotosintéticos y uno heterótrofo, y concluye que los dinoflagelados son un grupo productor principal de ácido docosahexanoico y contribuyen con una cantidad sustancial de dicho producto a la cadena trófica marina.

No se ha logrado el cultivo con éxito de dinoflagelados para producir un aceite comestible que contenga DHA. Los dinoflagelados en general crecen muy despacio y son sensibles a las fuerzas de corte. Guillard y col., *Dinoflagellates*, (1984) Academic Press. La técnica anterior describe que incluso una pequeña agitación en el recipiente de cultivo reduce el crecimiento de los cultivos. Sin embargo, dicha agitación sería necesaria para lograr la oxigenación adecuada para maximizar el crecimiento para la producción comercial.

Se cree que el DHA es esencial para el desarrollo adecuado del cerebro y la vista de los niños, porque como se ha señalado más arriba,

es el PUFA de cadena larga más abundante en el cerebro y en la retina. Aunque existe una ruta metabólica en los mamíferos para la biosíntesis del DHA a partir del ácido linoleico de los alimentos, esta ruta es bioenergéticamente desfavorable [Crawford, P. *AOCS. Short Course in Polyunsaturated Fatty Acids and Eicosanoids*, pág. 270-295 (1987)] y se cree que los mamíferos, igual que los peces, obtienen la mayor parte de su DHA a partir de fuentes alimenticias. En el caso de los niños, la fuente más probable sería la leche humana. En efecto, el DHA es el PUFA omega-3 C₂₀ más abundante en la leche humana. Sin embargo, generalmente el DHA está ausente en los preparados para lactantes. La patente U.S. n° 4.670.285 describe un preparado para lactantes que contiene ácidos grasos omega-3. Sin embargo, los ácidos que se usan en ella se obtienen del huevo o aceite de pescado (Talapia) y tienen asociadas las características desagradables descritas previamente. Además, los aceites de pescado generalmente contienen otro ácido graso omega-3, el ácido eicosapentanoico (EPA), un componente que no conviene en los preparados para lactantes debido a sus prolongados efectos anticoagulantes y a la disminución de los niveles de ácido araquidónico en los niños. Esta se ha correlacionado con tasas reducidas de aumento de peso de los niños (Carleson y col. *INFORM* 1:306). En efecto, los niveles de EPA son muy bajos en la leche humana (menos de una cuarta parte del DHA).

De acuerdo con esto, la presente invención proporciona un aceite unicelular comestible que se caracteriza porque el ácido docosahexanoico (DHA) constituye al menos el 15 % en peso del aceite, preferiblemente al menos el 20 %, más preferiblemente el 30 % y más preferiblemente el 35 %.

La presente invención también proporciona un procedimiento para producir un aceite comestible unicelular como se ha definido más arriba que comprende:

cultivar un microorganismo capaz de producir dicho aceite unicelular en un fermentador para lograr una densidad celular de al menos 10 gramos de biomasa por litro de una solución de nutrientes,

en el que el microorganismo es un dinoflagelado y en el que además se induzca al microorganismo, mediante la imposición de una fase estacionaria, a producir el aceite unicelular a una concentración de al menos aproximadamente 1,5 gramos por litro de solución de nutrientes, y

recoger la biomasa y recuperar el aceite unicelular del aceite de biomasa.

El aceite, caracterizado aquí como aceite "de diseño", después de su extracción se puede usar en los preparados para lactantes, alimentos infantiles, complementos alimenticios y productos farmacéuticos.

Además, sería conveniente adquirir un mayor conocimiento de la ruta metabólica de los ácidos grasos omega-3. Respecto a esto, el DHA isotópicamente marcado sería de gran utilidad. Sin embargo, hasta el momento no se conoce ningún procedimiento para producir cantidades abundantes de DHA isotópicamente

marcado. Por lo tanto, también es un objetivo de la presente invención proporcionar DHA isotópicamente marcado en suficiente cantidad para llevar a cabo dicha investigación.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere al cultivo de microorganismos, particularmente dinoflagelados, en un fermentador, la inducción de estos microorganismos para que produzcan cantidades importantes de aceite unicelular que contenga una alta proporción de DHA y la recuperación de dicho aceite. Tal como se usa aquí, "aceite unicelular" se refiere a un producto lipídico de un organismo unicelular. La presente invención también incluye organismos mutantes capaces de producir mayores cantidades de aceite unicelular que contenga al menos aproximadamente un 20% en peso de DHA e incluye aceite unicelular que contiene DHA.

La presente invención proporciona un procedimiento económico para obtener mayores niveles de aceites comestibles que contengan DHA. Adicionalmente, el procedimiento permite el cultivo comercial de dinoflagelados con densidades celulares elevadas.

Los aceites comestibles producidos por el procedimiento de esta invención no tienen sabores desagradables ni olores a pescado y tampoco tienen contaminantes medioambientales que se encuentran a menudo en los aceites que contienen DHA procedentes de fuentes convencionales. De acuerdo con esto, la presente invención además incluye alimentos que contienen el aceite de la invención.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1, 2 y 3 son ilustraciones gráficas de la acumulación de biomasa de *C. cohnii* frente al tiempo con la adición de diferentes nutrientes.

Descripción detallada del mejor procedimiento para poner en práctica la invención

De acuerdo con la presente invención, se cultivan microorganismos capaces de producir aceite unicelular que contenga DHA, en un fermentador en una solución de nutrientes capaz de sostener el crecimiento de dichos organismos. Preferiblemente el aceite unicelular contendrá al menos aproximadamente un 20% en peso de DHA.

En la presente invención se puede usar cualquier microorganismo capaz de producir un aceite comestible unicelular que contenga DHA. Por ejemplo, se pueden usar diatomeas fotosintéticas. Los microorganismos preferidos son los dinoflagelados marinos, incluyendo especies *Cryptothecodinium*. Se prefiere especialmente el *Cryptothecodinium cohnii*, un heterótrofo obligado que necesita un suministro de carbono reducido para su crecimiento. Se prefiere el *C. cohnii* porque contiene un perfil de ácidos grasos en el que el DHA es el único PUFA presente en cantidades suficientes (más de aproximadamente un 1% de la cantidad total de PUFA). Se han depositado muestras de estos organismos, designadas como MK8840, en la American Type Culture Collection at Rockville, Maryland, y número de acceso asignado 40750. Tal como se usa aquí, microorganismo o cualquier tipo específico de microorganismo, incluye cepas de tipo salvaje, mutante o recombinante. Cualquier microorganismo que produzca mayores ni-

veles de aceite que contenga DHA se considera que está dentro del alcance de esta invención. Una de las características de la presente invención es el reconocimiento de la capacidad de producir aceite comestible de los microorganismos tales como los dinoflagelados y la consiguiente solución al problema de mantener una fuente económica y fiable de dichos aceites. De acuerdo con esto, los microorganismos de tipo salvaje y recombinante diseñados para producir aceite unicelular que contiene DHA son un aspecto de esta invención. Dichos organismos recombinantes deben incluir aquellos diseñados para producir mayores cantidades de DHA en un aceite unicelular, mayores cantidades de aceite total, o ambos, comparado con las cantidades producidas por el mismo microorganismo de tipo salvaje, cuando se le suministran los mismos sustratos. También se deben incluir microorganismos diseñados para usar eficazmente sustratos más rentables produciendo la misma cantidad de aceite unicelular que contiene DHA comparado con el microorganismo de tipo salvaje.

En general, los expertos en la técnica considerarían que *C. cohnii* no es un organismo adecuado para el cultivo en un fermentador. Trabajos previos han comentado la mezcla extremadamente compleja de nutrientes que es necesaria para cultivar con éxito *C. cohnii*. Gold y col. *Protozoal*, 13:255-257 (1966); Guillard y col. en "Dinoflagellates", Academic Press (1984); Henderson y col., *Phytochemistry* 27: 1679-1683 (1988). Contrariamente, la presente invención consigue el cultivo de los microorganismos que producen DHA en un medio sencillo que contiene glucosa y extracto de levadura. El uso de estos componentes en una solución tal como agua de mar proporciona tasas de crecimiento y densidades celulares significativamente económicas. Por ejemplo, en el transcurso de una fermentación de 3-5 días, se pueden obtener densidades de célula *C. cohnii* de al menos 10 gramos de biomasa por litro de solución, y típicamente entre 20 y aproximadamente 40 gramos por litro. Dichas densidades no se habían logrado hasta el momento.

Aunque el cultivo se puede realizar en cualquier fermentador adecuado, preferiblemente el microorganismo crece en un fermentador de cubeta agitada (STF) o en un fermentador de emulsión de aire (ALF), ambos tipos son conocidos por los expertos en la técnica. Cuando se selecciona un STF, la agitación se proporciona usando turbinas de alta eficacia de tipo Rushton o paletas inclinadas o impulsores marinos. La agitación y el burbujeo renuevan el suministro de oxígeno a los microorganismos. La velocidad de agitación normalmente se aumenta al aumentar la biomasa, debido a la demanda creciente de oxígeno. Es conveniente mantener la velocidad rotativa a no más de 500 cm/seg, preferiblemente a no más de 300 cm/seg. La selección de cepas de microorganismos que sean capaces de aguantar mayores velocidades rotativas sin sufrir corte está dentro del ámbito de los expertos en la técnica. El uso de dichas cepas está expresamente incluido en esta invención.

Como se ha señalado más arriba, el agua de mar es un medio aceptable para la solución de

nutrientes. El agua de mar puede ser natural, filtrada o una mezcla artificial, cada una de las cuales se puede diluir a salinidades menores, tal como a la 1/2 ó 1/4 de la concentración normal, con agua corriente o se puede concentrar al doble de su concentración normal. Un ejemplo preferido es el agua de mar artificial de marca Instant Ocean® (IO). Aunque *C. cohnii* es un microorganismo marino, se ha observado algún crecimiento en salinidad cero. El uso de variantes que crezcan bien en salinidades reducidas está específicamente englobado en esta invención. Con salinidades mas bajas se pueden añadir y ser necesarios micronutrientes. Sin embargo, dichos micronutrientes son conocidos por los expertos en la técnica y generalmente están presentes en el agua de mar o agua corriente. Si el organismo seleccionado es heterótrofo, tal como *C. cohnii*, entonces se añade una fuente de carbono.

Preferiblemente, después de la adición del medio de agua de mar al fermentador, el fermentador que contiene el medio se esteriliza y se enfría antes de añadir los nutrientes y una población de siembra de microorganismos. (Aunque es aceptable esterilizar los nutrientes junto con el agua de mar, la esterilización de esta forma puede dar como resultado una pérdida de la glucosa disponible). Los nutrientes y microorganismos se pueden añadir simultáneamente o secuencialmente.

Los expertos en la técnica pueden determinar una cantidad eficaz de semillas. Cuando se usa un STF, se prefiere la adición de una población de entre aproximadamente 0,05 y 1,0 gramos de equivalente en peso seco por litro, al principio de la fermentación. Es decir aproximadamente 10⁶ células por ml. Por lo tanto, para un fermentador de 30 litros, se debe añadir 1-3 litros de medio de siembra, que contenga células viables con una densidad de 20 g de peso seco por litro.

Los niveles de oxígeno preferiblemente se mantienen en un nivel de O.D. de al menos aproximadamente un 10% de nivel de saturación de aire. La biosíntesis del DHA requiere oxígeno y, de acuerdo con esto, rendimientos altos de DHA requieren niveles de O.D. entre aproximadamente un 10% y un 50% de niveles de saturación de aire. Las velocidades rotativas de agitación de 150-200 cm/seg en combinación con una velocidad de aireación de 1 VVM (volumen de aire/volumen de fermentador por minuto) proporcionan niveles de O.D. entre aproximadamente un 20% y aproximadamente un 30% con densidades de biomasa de aproximadamente 25 g de peso seco/litro de cultivo. Densidades celulares mayores pueden necesitar niveles de O.D. mayores, que se pueden lograr aumentando las velocidades de aireación, mediante el burbujeo de O₂, o aumentando la presión de aire en el fermentador.

Los expertos en la técnica conocen fuentes de carbono aceptables. Por ejemplo, se puede proporcionar el carbono a *C. cohnii* en forma de glucosa. Otros heterótrofos pueden usar otras fuentes de carbono reducido, una cuestión que pueden determinar fácilmente los expertos en la técnica, y los autótrofos usan dióxido de carbono. *C. cohnii* también crecerá en otras fuentes de carbono reducido, más complejas. Típicamente, la

fermentación se inicia con aproximadamente 10-50 g/litro de glucosa. Se añade más glucosa durante la fermentación cuando es necesaria. Alternativamente, se pueden añadir inicialmente entre aproximadamente 50 y 150 g, preferiblemente entre 50 y 100 g de glucosa/litro, minimizando de esta forma la frecuencia de las adiciones futuras. Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente la cantidad de la fuente de carbono proporcionada a otros organismos.

Además de una fuente de carbono reducido, se suministra al medio una fuente de nitrógeno, tal como extracto de levadura (YE). El extracto de levadura disponible en el comercio es aceptable. Por ejemplo se puede usar el extracto de levadura de marca DIFCO o MARCOR. El extracto de levadura es una fuente de nitrógeno orgánico que también contiene micronutrientes. Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente otras fuentes de nitrógeno orgánico. Sin embargo, dichos compuestos generalmente son más caros que el extracto de levadura. El uso de variantes capaces de crecer en urea o nitratos está dentro del alcance de esta invención. Típicamente la fermentación se inicia con aproximadamente 6-12 g de YE/litro. Se puede añadir más YE cuando sea necesario. El curso de una fermentación típica requiere entre aproximadamente 8 y 15 g de YE/litro en su transcurso. De acuerdo con esto, esta cantidad de YE se puede añadir inicialmente con una menor necesidad de adiciones posteriores. Los expertos en la técnica pueden determinar la cantidad precisa. Generalmente, la proporción entre glucosa y YE es entre aproximadamente 2:1 y aproximadamente 15:1.

El cultivo se puede llevar a cabo a cualquier temperatura que mantenga la vida. Generalmente *C. cohnii* crecerá a temperaturas comprendidas entre aproximadamente 15°C y 34°C. Preferiblemente la temperatura se mantiene a aproximadamente 20-30°C. Se prefieren las cepas que crecen a mayor temperatura porque tendrán un tiempo de duplicación más rápido, reduciendo por lo tanto el tiempo de fermentación. Los expertos en la técnica determinan fácilmente los intervalos de temperatura adecuados para otros microorganismos.

El cultivo se puede llevar a cabo en un amplio intervalo de pH, típicamente entre aproximadamente pH 5,0 y 9,0. Preferiblemente, en la fase de crecimiento se usa un intervalo de pH entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 7,0. Se usa una base, tal como KOH o NaOH, para ajustar el pH del medio antes de la inoculación. Durante las últimas etapas de la fermentación, los medios de cultivo tienden a hacerse alcalinos. Si conviene, se puede controlar el pH con un ácido inorgánico para corregir la alcalinidad durante la fase de crecimiento.

La producción del aceite unicelular se induce en los dinoflagelados por imposición de una fase estacionaria (es decir, por una disminución del nitrógeno o aumento del pH). Las deficiencias de YE se producen proporcionando el YE en una cantidad limitada de forma que el medio agote el YE mientras sigue quedando disponible glucosa. La presente invención reconoce que es la proporción entre fuente de carbono y fuente de

nitrógeno lo que promueve la producción eficaz del aceite unicelular. Usando glucosa y YE por ejemplo, se prefiere una proporción entre fuente de carbono y fuente de nitrógeno de aproximadamente 10-15 partes de glucosa por 1 parte de YE. Los expertos en la técnica pueden calcular las proporciones similares para otras fuentes de carbono y nitrógeno.

Después de la inducción de la producción de aceite, el cultivo crece durante aproximadamente otras 24 horas adicionales. Durante este periodo de oleosíntesis, se está sintetizando el aceite unicelular que contiene DHA y aparecen claramente visibles gotas de aceite. Los expertos en la técnica pueden calcular fácilmente el tiempo de fermentación necesario para obtener la cantidad esperada de biomasa celular basándose en la cantidad de YE. Cuando ha pasado este tiempo, se crece el cultivo durante otras 24 horas adicionales y se recoge. En general, los *C. cohnii* se cultivan durante un tiempo suficiente para producir aceite unicelular, normalmente entre aproximadamente 60 y aproximadamente 90 horas, aunque este tiempo está sometido a variaciones.

Aproximadamente entre el 15 y el 30 % de la biomasa resultante, usando *C. cohnii* de tipo salvaje, consta de aceite extraíble. La selección de la cepa puede aumentar este porcentaje y dicha selección está dentro del alcance de esta invención. Preferiblemente, el aceite comprende más de aproximadamente un 70 % de triglicéridos que, en general, tienen la siguiente composición de ácidos grasos.

- 15-20 % ácido mirístico (C_{14:0})
- 20-25 % ácido palmítico (C_{16:0})
- 10-15 % ácido oleico (C_{18:1})
- 30-40 % DHA (C_{22:6})
- 0-10 % otros

(otros aceites componentes, incluyendo los lípidos polares, tales como la fosfatidil colina, también pueden estar enriquecidos en ADN). El aceite bruto se caracteriza por un color amarillo-naranja y es líquido a temperatura ambiente. Convenientemente, el aceite contiene al menos aproximadamente un 20 % en peso de DHA y más preferiblemente al menos aproximadamente un 35 % en peso de DHA.

Los organismos se recogen por medios convencionales, conocidos por los expertos en la técnica, tales como centrifugación, floculación o filtración, y se pueden procesar inmediatamente o secar para un procesamiento futuro. En cualquiera de los casos, el aceite se puede extraer fácilmente con una cantidad eficaz de disolvente. Los expertos en la técnica pueden determinar los disolventes adecuados. Sin embargo, entre los disolventes preferidos se incluyen hexano puro y fluidos supercríticos, tales como CO₂ supercrítico.

Los expertos en la técnica conocen las técnicas de extracción con fluidos supercríticos y están descritas por McHugh y col., en *Supercritical Fluid Extraction*, Butterworth, 1986. Si el disolvente de extracción es hexano, una proporción adecuada entre hexano y biomasa seca es aproximadamente 4 litros de hexano por kilogramo

de biomasa seca. Preferiblemente el hexano se mezcla con la biomasa en un recipiente de reacción agitado a una temperatura de aproximadamente 20-50°C durante aproximadamente 2 horas. Después de mezclar, la biomasa se filtra y se separa del hexano que contiene el aceite. Alternativamente, se puede extraer directamente una pasta de biomasa mojada (30-35 % de sólidos) con disolventes más polares, tales como el etanol, isopropanol o mezclas de hexano/isopropanol. La biomasa residual, es decir la biomasa de microorganismos, tal como *C. cohnii*, de la que se ha extraído el aceite comestible unicelular se puede usar como alimento para animales, y contiene aproximadamente un 35-40 % de proteínas, 8-10 % de cenizas y 45-50 % de carbohidratos. Debido a este alto contenido de proteínas y los elevados niveles de DHA, la pasta de biomasa entera se puede usar para alimentos para acuicultura (por ejemplo, gambas y similares, ostras, peces).

Después el disolvente se elimina del aceite mediante técnicas de destilación conocidas por los expertos en la técnica. El equipo de procesamiento de semillas de aceite convencional es adecuado para realizar la filtración separación y destilación. Se pueden llevar a cabo etapas de procesamiento adicionales, conocidas por los expertos en la técnica, si se requieren o convienen para una aplicación particular. Estas etapas también serán similares a las implicadas en el tratamiento de aceite vegetal convencional y permiten la separación de fracciones de lípidos polares enriquecidas con DHA.

Por el procedimiento de esta invención se pueden obtener fácilmente aceites unicelulares marcados isotópicamente, incluyendo DHA marcado, en cantidades suficientes para permitir la investigación de la ruta metabólica del DHA. Cuando se suministra ¹³C-glucosa o ¹⁴C -glucosa como sustrato de carbono reducido, resulta DHA marcado.

La presente invención también incluye productos alimentarios, tales como preparados para lactantes y alimentos infantiles, así como complementos alimenticios, que contienen el aceite unicelular que contiene DHA de la presente invención. Aunque los expertos en la técnica han reconocido que son convenientes los preparados para lactantes que contienen DHA, los preparados para lactantes de las técnicas anteriores contenían DHA procedente de aceite de pescado, con las consiguientes características de sabor y organolépticas desagradables. Además, el complemento de aceite de pescado de los preparados para lactantes incluye la adición de ácido eicosapentanoico (EPA), un ácido graso omega-3 que se sabe que tiene actividad anticoagulante y que posiblemente es responsable de la reducción de la biosíntesis del ácido araquidónico. Dicha actividad no es conveniente en los preparados para lactantes o alimentos infantiles y el aceite unicelular descrito aquí no contiene cantidades significativas de EPA. Los alimentos, tales como los preparados para lactantes, que contienen el aceite unicelular de la presente invención no tienen las características organolépticas desagradables del aceite de pescado. Por lo tanto, los alimentos son aceptados más fácilmente por los niños y también adultos. Preferiblemente el preparado para lac-

tantes de la presente invención contiene aproximadamente un 0,05% en peso de un aceite unicelular que contiene DHA. El alimento infantil de la presente invención, que tiene una constitución más sólida, preferiblemente contiene aproximadamente un 0,5% en peso de aceite unicelular que contiene DHA. En ambos casos más preferiblemente el aceite contiene al menos un 35% de DHA.

La presente invención incluye productos farmacéuticos que incluyen un aceite unicelular que contiene DHA. Preferiblemente los productos contienen al menos aproximadamente un 35% de DHA. Un ejemplo de tales productos farmacéuticos es uno que sea adecuado para proporcionar nutrición parenteral total (TPN) a niños o adultos. Adicionalmente, se engloban los complementos alimenticios que contienen el aceite unicelular. Preferiblemente, dichos complementos están en forma de cápsulas de gelatina que encapsulan dicho aceite y pueden ser apropiados para mujeres embarazadas o mujeres lactantes. Esto puede ser especialmente cierto para dichas mujeres que son vegetarianas y no toman suficientes cantidades de DHA en sus dietas.

La presente invención también incluye aceite unicelular que contiene DHA. Preferiblemente el aceite unicelular contiene al menos un 20% en peso de DHA. Más preferiblemente el aceite contiene al menos aproximadamente un 35% en peso de DHA.

Habiéndose descrito de forma general la presente invención, ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos específicos no limitantes.

Ejemplo 1
Un STF con un volumen de trabajo de 30 litros se cargó con medio de agua de mar artificial de media concentración. Se combinaron seis litros de IO con 18 litros de agua corriente. El fermentador que contenía el medio se esterilizó y enfrió a 28°C. Se añadieron al medio cuatrocientos ml de YE concentrado (455 g/l), 900 ml de jarabe de glucosa (400 g/l) y un litro de inoculado procedente de un fermentador de siembra que contenga aproximadamente 2×10^7 células/ml o una biomasa de 20 g/litro (dando una concentración final de aproximadamente 7×10^6 células/ml o una biomasa de aproximadamente 700 mg/litro). Se fijó la agitación a una velocidad rotativa periférica de 120 cm/seg y la aireación se fijó en 1 VVM (30 litros por minuto). Adicionalmente se añadió jarabe de glucosa (900 ml) después de 30 horas y otros 4,2 litros en las siguientes 42 horas. Por lo tanto se añadieron 6 litros de jarabe de glucosa en total. Se añadió una solución de YE concentrado (400 ml) en la hora 6 y se añadieron otros 1,2 litros en las siguientes 48 horas hasta que se habían añadido un total de 2,0 horas. Para mantener el O.D. a más del 20%, a las 24 horas la velocidad rotativa periférica de agitación se aumentó a 150 cm/seg y a las 48 horas a 160 cm/seg. A las 72 horas la velocidad rotativa se aumentó a 200 cm/seg y se dejó crecer el cultivo durante un tiempo adicional suficiente para convertir la carga final de glucosa en aceite celular. Las condiciones de cultivo se describen gráficamente en la figura 1. Después el cultivo se recogió por centrifugación

y se conservó el sedimento celular. El sedimento recogido de las células se congeló y secó (liofilizó) a un contenido de humedad de aproximadamente el 4%. Se añadió hexano (2,8 litros) a la biomasa seca y se agitó en un hervidor de vidrio durante 1,5 horas a 50°C. Se usó un rotavapor para eliminar el hexano, produciendo aproximadamente 175 g de aceite bruto que contenía DHA.

Ejemplo 2

Un STF con un volumen de trabajo de 350 litros se cargó con medio de agua de mar artificial de media concentración hecho por combinación de 4,3 kg de I.O.[®] y 230 litros de agua corriente. El fermentador con el medio se esterilizó y enfrió a 28°C. Se añadieron al medio 6,8 litros de YE concentrado (400 g/l), 12,5 litros de jarabe de glucosa (400 g/l) y 30 litros de inoculado de *C. cohnii* procedente del fermentador de semilla (10^6 células/ml o una densidad de biomasa de aproximadamente 1,3 g/litro). Se fijó la agitación a una velocidad rotativa periférica de 73 cm/seg y la aireación se fijó en 1 VVM (280 litros por minuto). Después de aproximadamente 44 horas se añadió jarabe de glucosa adicional (12 litros) y otros 43 litros en las siguientes 32 horas. Por lo tanto, se añadieron 67,5 litros de jarabe de glucosa en total. Las adiciones de glucosa y el crecimiento celular se describen gráficamente en la figura 2.

Para mantener el O.D. a más del 20%, a las 44 horas la velocidad rotativa de agitación se aumentó a 175 cm/seg y a las 55 horas a 225 cm/seg. A las 76 horas, la velocidad rotativa se disminuyó a 150 cm/seg y se dejó crecer el cultivo durante un tiempo adicional suficiente para convertir la carga final de glucosa en aceite celular. Después se recogió el cultivo. Las células recogidas se secaron a un contenido de humedad de aproximadamente un 4%. Se añadió hexano a la biomasa seca y se agitó en un hervidor de vidrio durante 2 horas a 25°C. Se usó un rotavapor para eliminar el hexano, produciendo aproximadamente 700 g de aceite bruto que contenía DHA.

Ejemplo 3

Un STF con un volumen de trabajo de 30 litros se cargó con medio de agua de mar artificial de concentración normal hecho por combinación de 565 g de I.O.[®] con 15 litros de agua corriente. El fermentador con el medio se esterilizó y se enfrió a 28°C. Se añadieron al medio cuatrocientos ml de YE concentrado (400 g/l), 1,9 litros de jarabe de glucosa (400 g/l) y 1 litro de inoculado de *C. cohnii* procedente de un fermentador de siembra (10^6 células/ml o una biomasa de aproximadamente 2,0 g/litro). Se fijó la agitación a una velocidad rotativa periférica de 80 cm/seg y se fijó la aireación a 1 VVM (20 litros por minuto). Después de 94 horas se añadió jarabe de glucosa adicional (1,5 l) y otros 1,1 litros a las 116 horas. Por lo tanto se añadieron en total 4,5 litros. Para mantener el O.D. a más del 20%, a las 52 horas la velocidad rotativa de agitación se aumentó a 160 cm/seg. A las 66 horas se indujo una fase estacionaria y para llevar a cabo esto, se ajustó el pH a 7,0 con KOH 4 N y no se aumentó más la velocidad rotativa de agitación durante el ensayo. Como se muestra en la figura 3, se dejó crecer el cultivo durante un tiempo adicional suficiente

para convertir la carga final de glucosa en aceite celular. Después se recogió el cultivo. Las células recogidas se secaron a un contenido de humedad de aproximadamente el 4%. Se añadió hexano

a la biomasa seca y se agitó en un recipiente de vidrio durante 1,5 horas a 50°C. Se usó un rotavapor para eliminar el hexano, produciendo 65 g de aceite conteniendo DHA bruto.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un aceite comestible unicelular que se **caracteriza** porque el ácido docosahexanoico (DHA) constituye al menos un 15 % en peso del aceite, preferiblemente al menos un 20 %, más preferiblemente al menos un 30 % y más preferiblemente al menos un 35 %.

2. Un aceite según la reivindicación 1, que no contiene una cantidad significativa de EPA.

3. Un aceite según la reivindicación 1 ó 2, que se obtiene a partir de dinoflagelados, preferiblemente de especies *Crypthecodinium*, más preferiblemente de *Crypthecodinium cohnii*.

4. Un procedimiento para producir un aceite comestible unicelular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, cultivando un microorganismo capaz de producir dicho aceite unicelular en un fermentador para alcanzar una densidad celular de al menos aproximadamente 10 gramos de biomasa por litro de solución de nutrientes, recogiendo la biomasa y recuperando el aceite unicelular de la biomasa, en el que el microorganismo es un dinoflagelado y se induce al microorganismo a producir aceite unicelular en una concentración de al menos aproximadamente 1,5 gramos por litro de solución de nutrientes por imposición de una fase estacionaria.

5. Un procedimiento según la reivindicación 4, en el que el microorganismo es del género *Crypthecodinium*, preferiblemente *Crypthecodinium cohnii*.

6. Un procedimiento según la reivindicación 4 ó 5, en el que la solución de nutrientes comprende agua de mar o agua de mar artificial.

7. Un procedimiento según la reivindicación 6, en el que la solución de nutrientes comprende agua de mar de salinidad reducida o agua de mar artificial de salinidad reducida.

8. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en el que la solución de nutrientes comprende una fuente de carbono reducido y una fuente de nitrógeno orgánico.

9. Un procedimiento según la reivindicación 8, en el que la proporción entre la fuente de carbono reducido y la fuente de nitrógeno orgánico es equivalente a una proporción entre glucosa y extracto de levadura de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 15 partes de glucosa por 1 parte de extracto de levadura.

10. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, que además comprende mantener un nivel de oxígeno disuelto de al menos aproximadamente un 10 % de saturación de aire sustancialmente durante toda la fermentación.

11. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, en el que el microorganismo se cultiva a una densidad celular de al menos 20 gramos de biomasa por litro de solución de nutrientes.

12. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 11 para la producción de un aceite comestible unicelular que contiene al menos un 20 % en peso de DHA, comprendiendo dicho procedimiento:

(a) añadir aproximadamente 10^6 células/ml (0,5-1,0 g de peso seco/litro) de *C. cohnii* a un fer-

mentador que inicialmente contiene una solución de nutrientes que comprende agua de mar artificial de una concentración entre un cuarto y un medio, 1-8 % de glucosa y 0,4-0,8 % de extracto de levadura;

(b) cultivar dicho *C. cohnii* a una temperatura entre aproximadamente 15°C y aproximadamente 34°C y a un pH entre aproximadamente 5,0 y 9,0;

(c) añadir de forma creciente glucosa y extracto de levadura a dicha solución de nutrientes durante aproximadamente 56 horas;

(d) añadir más glucosa a dicha solución de nutrientes durante aproximadamente 16 horas adicionales para inducir en dicho *C. cohnii* la producción de aceite;

(e) mantener un contenido de oxígeno disuelto de al menos aproximadamente un 20 % de nivel de saturación de aire durante dicha cultivo;

(f) recoger dicho *C. cohnii* después de aproximadamente entre 60 y 90 horas; y

(g) recuperar dicho aceite comestible unicelular.

13. Un producto alimentario o farmacéutico que contiene un aceite comestible unicelular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o producido por un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 12.

14. Un alimento según la reivindicación 13 que es un preparado para lactantes, un alimento infantil o un complemento alimenticio.

15. Un producto farmacéutico según la reivindicación 13, que es adecuado para usar para proporcionar una nutrición parenteral total o como complemento alimenticio.

16. Un alimento para animales que comprende una biomasa de microorganismos cultivada por un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 12.

17. Un alimento para animales según la reivindicación 16, en el que la biomasa se ha tratado con un disolvente tal que al menos algo del aceite se extrae en el disolvente.

18. Un alimento para animales según la reivindicación 16 ó 17 que es un alimento para acuicultura.

19. Uso de una biomasa microbiana como alimento para acuicultura, habiéndose producido la biomasa por cultivo de un microorganismo capaz de producir un aceite unicelular en el que el DHA constituye al menos un 15 % en peso del aceite, en un fermentador para alcanzar una densidad celular de al menos aproximadamente 10 gramos de biomasa por litro de solución de nutrientes y recoger la biomasa, en la que el microorganismo es un dinoflagelado y se induce al microorganismo a producir el aceite unicelular a una concentración de al menos 1,5 gramos por litro de solución de nutrientes mediante la imposición de una fase estacionaria.

20. Uso según la reivindicación 19, en el que la acuicultura comprende gambas y similares ostras y peces.

21. Uso de un aceite unicelular según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o producido por un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 12 para la preparación de un alimento, un producto adecuado para propor-

cionar nutrición parenteral total o un producto adecuado como complemento alimenticio.

22. Uso según la reivindicación 21, en el que

el alimento es un preparado para lactantes, un alimento infantil o un complemento alimenticio.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

NOTA INFORMATIVA: Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

60

65

Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.

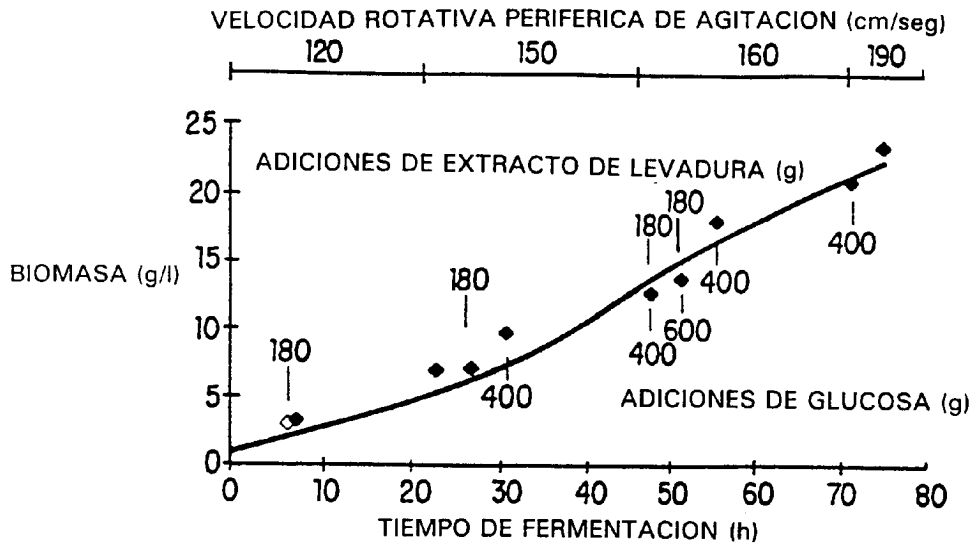


FIG. 1

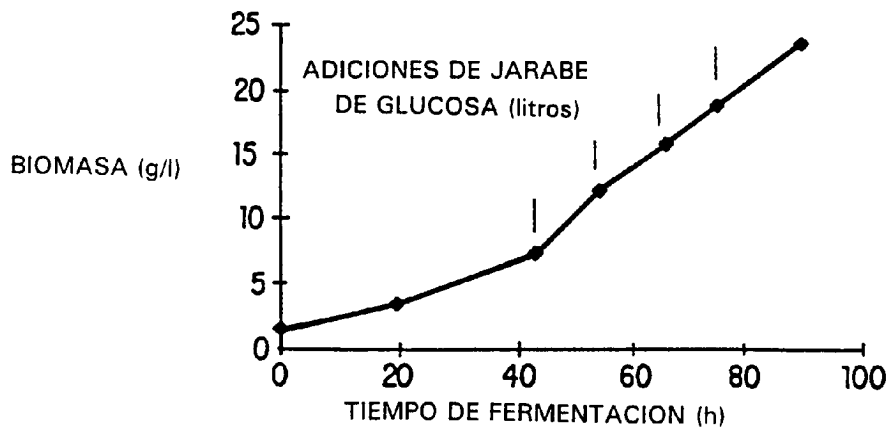


FIG. 2

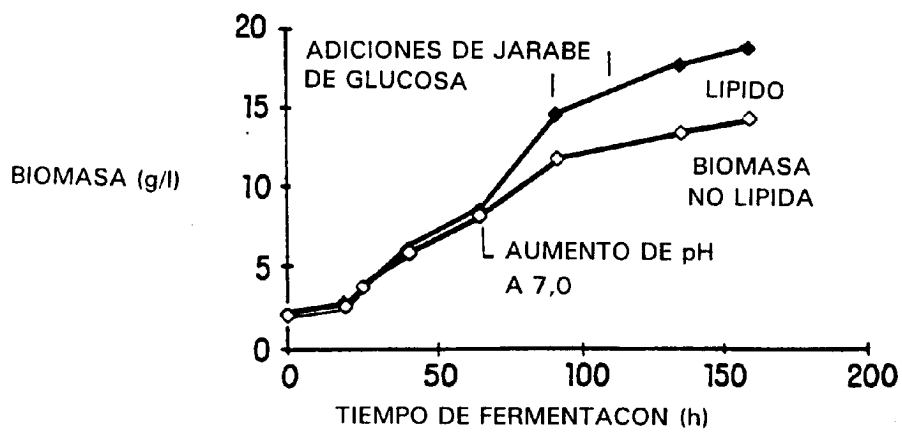


FIG. 3