



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 208 141**

⑤① Int. Cl.7: **A23B 7/10**  
**A23D 9/00**  
**C12N 1/00**  
**C12P 7/64**

⑫

TRADUCCIÓN DE REIVINDICACIONES DE SOLICITUD  
DE PATENTE EUROPEA

T1

- ⑧⑥ Número de solicitud europea: **01903376.0**  
⑧⑥ Fecha de presentación de la solicitud: **26.01.2001**  
⑧⑦ Número de presentación de la solicitud: **1251744**  
⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **30.10.2002**

③⑩ Prioridad: **28.01.2000 US 178588 P**

④③ Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.06.2004**

④⑥ Fecha de publicación de la traducción de las  
reivindicaciones: **16.06.2004**

⑦① Solicitante/s:  
**MARKET BIOSCIENCES CORPORATION**  
**6480 Dobbin Road**  
**Columbia MD 21045, US**

⑦② Inventor/es: **Reucker, Craig, M.;**  
**Dimasi, Don;**  
**Hansen, Jon, M.;**  
**Mirrasoul, Peter, J.;**  
**Bailey, Richard, B.;**  
**Weeder, George, T., III;**  
**Kaneko, Tatsuo y**  
**Barclay, William, R.**

⑦④ Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

⑤④ Título: **Producción aumentada de lípidos que contienen ácidos grasos poliénoicos por cultivos de alta densidad de microbios eucariotas en fermentadores.**

ES 2 208 141 T1

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir lípidos que contienen ácidos grasos poliénoicos a partir de microorganismos eucariotas capaces de producir por lo menos aproximadamente el 20% de su biomasa en forma de lípidos, que comprende añadir a un medio de fermentación que comprende dichos microorganismos una fuente de carbono no alcohólica y una fuente de nutrientes limitadora en una proporción suficiente para incrementar la densidad de biomasa de dicho medio de fermentación hasta por lo menos aproximadamente 100 g/l.

2. Procedimiento para cultivar microorganismos eucariotas capaces de producir por lo menos aproximadamente el 20% de su biomasa en forma de lípidos, comprendiendo dicho procedimiento añadir a un medio de fermentación que comprende dichos microorganismos una fuente de carbono y una fuente de nutrientes limitadora en una relación suficiente para incrementar la densidad de biomasa de dicho medio de fermentación hasta por lo menos aproximadamente 100 g/l, en el que dicho procedimiento produce por lo menos una proporción de aproximadamente 0,5 g/l/hora de lípidos, y en el que por lo menos aproximadamente el 15% de los lípidos totales producidos por dichos microorganismos son lípidos poliinsaturados.

3. Procedimiento para cultivar microorganismos eucariotas que comprende añadir a un medio de fermentación que comprende dichos microorganismos una fuente de carbono y una fuente de nutrientes limitadora en una proporción suficiente para incrementar la densidad de biomasa de dicho medio de fermentación hasta por lo menos aproximadamente 100 g/l, en el que se seleccionan dichos microorganismos de entre el grupo que comprende algas, hongos (incluyendo la levadura), protistas, bacterias y mezclas de los mismos, y en el que dichos microorganismos son capaces de producir por lo menos aproximadamente el 20% de su biomasa en forma de lípidos que comprenden unos ácidos grasos poliénoicos.

4. Procedimiento para producir lípidos microbianos eucariotas, que comprende:

- (a) cultivar microorganismos eucariotas en un medio de fermentación para incrementar la densidad de biomasa de dicho medio de fermentación hasta por lo menos aproximadamente 100 g/l;
- (b) proporcionar condiciones de fermentación suficientes para permitir que dichos microorganismos produzcan dichos lípidos; y
- (c) recuperar dichos lípidos, en el que más de aproximadamente el 15% de dichos lípidos son lípidos poliinsaturados.

5. Procedimiento para producir lípidos microbianos eucariotas, que comprende:

- (a) añadir una fuente de carbono no alcohólica y una fuente de nutrientes limitadora a un medio de fermentación que comprende dichos microorganismos;
- (b) proporcionar condiciones suficientes para que dichos microorganismos produzcan dichos lípidos microbianos; y

(c) recuperar dichos lípidos microbianos,

en el que por lo menos aproximadamente el 15% de dichos lípidos microbianos son lípidos poliinsaturados.

6. Procedimiento para producir lípidos microbianos eucariotas, que comprende:

- (a) añadir una fuente de carbono y una fuente de nutrientes limitadora a un medio de fermentación que comprende microorganismos eucariotas y proporcionar condiciones suficientes para mantener un nivel de oxígeno disuelto de por lo menos aproximadamente el 4% en dicho medio de fermentación para producir una densidad de biomasa de por lo menos aproximadamente 100 g/l;
- (b) proporcionar condiciones suficientes para mantener un nivel de oxígeno disuelto de aproximadamente el 1% o menos en dicho medio de fermentación y proporcionar condiciones suficientes para permitir que dichos microorganismos produzcan dichos lípidos; y
- (c) recuperar dichos lípidos microbianos,

en el que por lo menos aproximadamente el 15% de dichos lípidos microbianos son lípidos poliinsaturados.

7. Procedimiento para enriquecer el contenido en ácidos grasos poliénoicos de un microorganismo, que comprende fermentar dicho microorganismo en un medio de cultivo que presenta un nivel de oxígeno disuelto menor del 10%.

8. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho procedimiento comprende una fase de aumento de la densidad de biomasa y una fase de producción, en el que dicha fase de aumento de la densidad de biomasa comprende añadir dicha fuente de carbono y dicha fuente de nutrientes limitadora y dicha fase de producción comprende añadir dicha fuente de carbono sin adición o con adición reducida de dicha fuente de nutrientes limitadora, para inducir condiciones de nutrientes limitadoras que induzcan la producción de lípidos.

9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 4, 5 ó 8, en el que la cantidad de oxígeno disuelto presente en dicho medio de fermentación durante dicha fase de producción o dicha etapa de producción de lípidos es menor que la cantidad de oxígeno disuelto presente en dicho medio de fermentación durante dicha fase de aumento de la densidad de biomasa o dicha etapa de cultivo de microorganismos.

10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 4, 5 ó 8, en el que la cantidad de oxígeno disuelto en dicho medio de fermentación durante dicha etapa de aumento de la densidad de biomasa o dicha etapa de cultivo de microorganismos es por lo menos aproximadamente el 4%.

11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 4, 5 ó 8, en el que la cantidad de oxígeno disuelto en dicho medio de fermentación durante dicha fase de producción o dicha etapa de producción de lípidos es menor de aproximadamente el 1%.

12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 5, en el que dicha fuente de carbono no alcohólica comprende un carbohidrato.

13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 5 ó 36, en el que dicha fuente de

nutrientes limitadora se selecciona de entre el grupo que comprende fuentes de nitrógeno, fuentes de carbono, fuentes de fosfato, fuentes de vitaminas (tales como fuentes de vitamina B12, fuentes de pantotenoato, fuentes de tiamina), fuentes de oligometales (tales como fuentes de zinc, fuentes de cobre, fuentes de cobalto, fuentes de níquel, fuentes de hierro, fuentes de manganeso, fuentes de molibdeno), y fuentes de metales mayores (tales como fuentes de magnesio, fuentes de calcio, fuentes de sodio, fuentes de potasio), fuentes de sílice y mezclas de las mismas.

14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 5 ó 36, en el que dicha fuente de nutrientes limitadora es una fuente de oligometales o una fuente de metales mayores seleccionada de entre el grupo que consiste en sales de sulfato y de cloruro de tales metales (tales como  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ;  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ;  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ;  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ ;  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ;  $NiSO_4 \cdot 6H_2O$ ;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ;  $CaCl_2$ ;  $K_2SO_4$ ;  $KCl$ ; y  $Na_2SO_4$ ) y mezclas de los mismos.

15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 5 ó 36, en el que dicha fuente de nutrientes limitadora comprende una fuente de nitrógeno.

16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 5 ó 36, en el que dicha fuente de nutrientes limitadora comprende una sal amónica inorgánica.

17. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 5 ó 36, en el que dicha fuente de nutrientes limitadora comprende hidróxido de amonio.

18. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 5 ó 36, en el que se controla el pH del medio de fermentación por medio de dicha fuente de nutrientes limitadora.

19. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho medio de fermentación o dicho medio de cultivo presenta una temperatura de por lo menos aproximadamente 20°C.

20. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho procedimiento produce lípidos en una proporción media de por lo menos aproximadamente 0,5 g/l/hora.

21. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho procedimiento produce lípidos en una proporción media de por lo menos aproximadamente 0,5 g/l/hora y en el que por lo menos aproximadamente el 15% de dichos lípidos son lípidos poliinsaturados.

22. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho procedimiento produce lípidos en una proporción media de por lo menos aproximadamente 0,5 g/l/hora, y en el que la cantidad total de ácidos grasos omega-3 y omega-6 es por lo menos aproximadamente el 20% de dichos lípidos.

23. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho procedimiento produce lípidos en una proporción media de por lo menos aproximadamente 0,5 g/l/hora y en el que por lo menos aproximadamente el 25% de dichos lípidos es el ácido docosahexaenoico.

24. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que se seleccionan dichos microorganismos de entre el grupo que comprende algas, hongos (incluyendo la levadura), protistas, bacterias y mezclas de los mismos, en el que dichos mi-

croorganismos son capaces de producir ácidos grasos poliénoicos u otros lípidos que anteriormente se creía que requerían oxígeno para su síntesis.

25. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que se seleccionan dichos microorganismos de entre el grupo que comprende algas, hongos (incluyendo la levadura), protistas, bacterias y mezclas de los mismos, en el que dichos microorganismos son capaces de producir ácidos grasos poliénoicos u otros lípidos que anteriormente se creía que requerían oxígeno para su síntesis y en el que dichos microorganismos se cultivan en un procedimiento de lote alimentado.

26. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dichos microorganismos se seleccionan de entre el grupo que comprende algas, hongos (incluyendo la levadura), protistas, bacterias y mezclas de los mismos, en el que dichos microorganismos son capaces de producir ácidos grasos poliénoicos u otros lípidos que anteriormente se creía que requerían oxígeno para su síntesis y en el que se cultivan dichos microorganismos en un procedimiento de lote alimentado y que comprende además mantener un nivel de oxígeno menor que aproximadamente el 3% de saturación en dicho medio de fermentación durante la fase de producción de dicho procedimiento de fermentación.

27. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dichos microorganismos son microalgas y microorganismos a modo de algas.

28. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dichos microorganismos son *Stramenopiles*.

29. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dichos microorganismos son del orden de *Traustozytriales*.

30. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dichos microorganismos se seleccionan de entre el grupo que comprende *Thraustozytrium*, *Schizozytrium*, y mezclas de los mismos.

31. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que dicho procedimiento además comprende:

- (a) una fase de aumento de la densidad de biomasa, en la que el nivel de oxígeno disuelto en el medio de fermentación es por lo menos de aproximadamente el 4%; y
- (b) una fase de producción elevada de lípidos, en la que el nivel de oxígeno disuelto en el medio de fermentación es menor de aproximadamente el 1%.

32. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2, 3, 6 ó 36, en el que dicha fuente de carbono es una fuente de carbono no alcohólica.

33. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho procedimiento produce de promedio por lo menos aproximadamente 0,2 g/l/hora de ácido docosahexaenoico.

34. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que dicha etapa de recuperación de lípidos comprende:

- (d) eliminar el agua de dicho medio de fermentación para proporcionar microorganismos secos; y
- (e) aislar dichos lípidos de dichos microorganismos secos.

35. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que dicha etapa de recuperación de lípidos comprende:

- (d) tratar el caldo de fermentación para permeabilizar, lisar o romper las células microbianas; y
- (e) recuperar los lípidos del caldo de fermentación a través de separación por gravedad, con o sin la ayuda de un agente para coadyuvar en romper la emulsión lípido/agua.

36. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que dicha etapa de cultivo de microorganismos comprende añadir una fuente de carbono y una fuente de nutrientes limitadora.

37. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6, en el que dicha etapa de recuperación de lípidos comprende:

- (d) eliminar el agua de dicho medio de fermentación para proporcionar microorganismos secos; y
- (e) aislar dichos lípidos de dichos microorganismos secos.

38. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6, en el que dicha etapa de recuperación de lípidos comprende:

- (d) evaporar el agua de dicho medio de fermentación sin centrifugación previa para proporcionar microorganismos secos; y
- (e) aislar dichos lípidos de dichos microorganismos secos.

39. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6, en el que dicha etapa de recuperación de lípidos comprende:

- (d) tratar el caldo de fermentación para permeabilizar, lisar o romper las células microbianas; y

- (e) recuperar los lípidos del caldo de fermentación a través de separación por gravedad, con o sin la ayuda de un agente para coadyuvar en romper la emulsión lípido/agua.

40. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 ó 44, en el que dicho nivel de oxígeno disuelto es menor del 5%.

41. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 ó 44, en el que dicho nivel de oxígeno disuelto es menor del 1%.

42. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que durante una fase de cultivo inicial, el nivel de oxígeno disuelto es mayor de aproximadamente el 10% y durante una fase de producción posterior el nivel de oxígeno disuelto es menor del 10%.

43. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que dicho microorganismo contiene genes de policeturo sintetasa.

44. Procedimiento heterótrofo para producir productos y microorganismos que comprende:

- (a) cultivar dichos microorganismos en un medio de cultivo en el que dichos microorganismos contienen genes de policeturo sintetasa; y
- (b) mantener el nivel de oxígeno disuelto a un nivel inferior a aproximadamente el 10%.

45. Procedimiento según la reivindicación 44, en el que dichos genes de policeturo sintetasa se encuentran naturalmente en dichos microorganismos.

46. Procedimiento según la reivindicación 44, en el que dichos genes de policeturo sintetasa se introducen genéticamente en dichos microorganismos.

47. Procedimiento según la reivindicación 44, en el que durante una fase de cultivo inicial, el nivel de oxígeno disuelto es mayor de aproximadamente el 10% y durante una fase de producción posterior el nivel de oxígeno disuelto es menor de aproximadamente el 10%.

---

**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.

---

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

---



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① N° de publicación : ES 2 208 141 T1

② Número de solicitud: E 01903376

## CORRECCIÓN DE ERRATAS DEL FOLLETO DE PATENTE

Pág./Inid	Errata	Corrección
1/71	MARKET BIOSCIENCES CORPORATION 6480 DOBBIN ROAD MD 21045 COLUMBIA, US	MARTEK BIOSCIENCES CORPORATION 6480 DOBBIN ROAD MD 21045 COLUMBIA, US