

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 305**

51 Int. Cl.:  
**C12P 7/64**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04803117 .3**

96 Fecha de presentación: **10.11.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1685255**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.08.2006**

54 Título: **Proceso para el cultivo de microorganismos de la especie Thraustochytriales**

30 Prioridad:  
**10.11.2003 DE 10352837**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**20.09.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**20.09.2012**

73 Titular/es:  
**Lonza Ltd  
Münchensteinerstrasse 38  
4002 Basel, CH**

72 Inventor/es:  
**LUY, Markus y  
RÜSING, Matthias**

74 Agente/Representante:  
**Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 387 305 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCION

Proceso para el cultivo de microorganismos de la especie *Thraustochytriales*

Diversos ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs para polyunsaturated fatty acids), y especialmente ácidos grasos omega-3 (ácidos grasos n3), son componentes esenciales de la nutrición humana.

5 Sin embargo es sabido que en la mayor parte de naciones industriales, el abastecimiento con ácidos grasos n3 es deficiente. Por el contrario, la fracción grasa total en la nutrición, así como la alimentación de ácidos grasos saturados y ácidos grasos n6 es demasiado elevada. Esto se basa en una modificación de nuestra composición alimenticia, que ha tenido lugar sobre todo aproximadamente en los últimos 150 años, y se ha correlacionado con la aparición de diversas enfermedades crónicas de la civilización, como por ejemplo enfermedades circulatorias - la causa principal de mortandad en zonas industriales - (Simopoulos, A. P., 1999, Am. J. Clin. Nutr. 70, 560-569). Entre tanto, una pluralidad de estudios ha mostrado que mediante el aumento selectivo de la alimentación de ácidos grasos n3, en especial de ácido eicosapentanoico (EPA) y de ácido docosahexanoico (DHA), se puede reducir significativamente el riesgo circulatorio (GISSI-Prevenzione Investigators (Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico), 1999, Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-prevenzione trial., Lancet 354, 447-455; Burr et al., 1989, Effects of changes in fat, fish, and fibre intake on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). Lancet 2, 757-761): correspondientemente se recomienda por diversas organizaciones (WHO, FAO, AHA, ISSFAL, British Nutrition Foundation u.v.a.) aumentar significativamente la alimentación de ácidos grasos n3 (Kris-Eherton et al., Fish Consumption, Fish Oil, Omega-3 Fatty Acids, and Cardiovascular Disease. Circulation 2002, 2747-2757).

20 Fuentes para la obtención de PUFAs, y en especial ácidos grasos n3, son sobre todo peces marinos de agua fría y aceites obtenidos a partir de los mismos, pero también microorganismos marinos que tienen la ventaja, frente a peces, de poder ser empleados en fermentadores para la producción de PUFAs bajo condiciones económicas y controladas. En el caso de una obtención por fermentación no existe peligro de impurezas, como se describen para peces o aceites de pescado obtenidos a partir de los mismos (Olsen SF. Int J Epidemiol. 2001: 1279-80). Además se puede influir positivamente sobre la composición de los aceites obtenidos mediante selección del organismo y las condiciones de cultivo, y no se está sometido a fluctuaciones de temporada, como se describe igualmente para peces y productos de pescado (Gamez-Meza et al. Lipids 1999: 639-42).

30 Microorganismos que son apropiados para la obtención de PUFA n3 se encuentran, a modo de ejemplo, en las bacterias bajo la especie *Vibrio* (por ejemplo: *Vibrio marinus*), o bajo los Dinoflagellaten (*Dinophyta*), en especial la especie *Cryptocodinium*, como *C. cohnii*, o bajo los *Stramenopiles*, como *Pinguiophyceae*, como por ejemplo *Glossomastix*, *Phaeomonas*, *Pinguiochrysis*, *Pinguicoccus* y *Polydochrysis*. Microorganismos preferentes para la obtención por fermentación de PUFA pertenecen a *Stramenopiles* (o *Labyrinthulomycota*), en especial a la especie *Thraustochytriales* (*Thraustochytriidea*), y a su vez en particular a las especies *Japonychytrium*, *Schizochytrium*, *Thraustochytrium*, *Althornia*, *Labyrinthuloides*, *Aplanochytrium* y *Ulkenia*.

35 Es sabido que algunos de los citados microorganismos se pueden emplear para la producción industrial de ácidos grasos, se describieron algunos procedimientos. De este modo, la solicitud de patente internacional WO 91/07498 A1 da a conocer la obtención de PUFAs con organismos de las especies *Schizochytrium* y *Thraustochytrium*. La WO 91/11918 A1 da a conocer la obtención de PUFAs con *Cryptocodinium cohnii*, la WO 96/33263 A1 y la correspondiente solicitud de patente europea EP 0 823 475 A1 describen la obtención de PUFAs con microorganismos de la especie *Schizochytrium*, mientras que la solicitud de patente WO 98/03671 da a conocer la obtención de PUFAs con microorganismos de la especie *Ulkenia*.

45 El espacio vital natural de los microorganismos descritos, y en especial de *Labyrinthulomycota*, son hábitats marinos. Convencionalmente, éstos microorganismos se cultivan en medios correspondientemente salinos, definiéndose el contenido en sal del agua marina en 32-35 g/l, y una fracción de un 90-95 % en sodio y cloruro, para los fines de la presente invención. Medios típicos para el cultivo de microorganismos marinos, como *Thraustochytrium* o *Schizochytrium* se basan en agua marina (por ejemplo ATCC (American Type Culture Collection) 790 By + Medio [extracto de levadura 1,0 g, peptona 1,0 g, D+-glucosa 5,0 g, agua marina 1L]). No obstante, también se sabe que los microorganismos de la especie *Thraustochytriales* pueden sobrevivir en el medio de cultivo con salinidad muy reducida. No obstante, su crecimiento se considera muy reducido y sin máximos intermedios en el intervalo de salinidad reducido por debajo de un límite de 7,5 - 15 g de sal/L, correspondientemente a una salinidad de un 7,5 - 15 %. Se consiguen velocidades de crecimiento óptimas sólo por encima de los límites de salinidad indicados anteriormente (Fan et al. Botanica Marina 45, 2002, páginas 50-57).

55 Un problema de procesos fermentativos que se presenta frecuentemente son las fuertes oscilaciones de pH en el desarrollo del cultivo como consecuencia de la aparición de productos metabólicos y/o del consumo de componentes de medio aislados. Esto es válido en especial para medios ricos en sales para la fermentación de microorganismos marinos. Por lo tanto, tales fermentaciones requieren frecuentemente una regulación de pH. Sin embargo, en el caso de fermentaciones a gran escala, el control del valor de pH conduce a un gasto añadido considerable. En este caso

se requieren depósitos adicionales para la adición de ácidos y bases, que se pueden emplear de otro modo para la alimentación de componentes aditivos. Además, la titración para la regulación del valor de pH se debe controlar técnicamente. En relación con la fermentación de Labyrinthulomycota para la obtención de PUFA a escala de producción, en el estado de la técnica se emplean métodos de cultivo controlados mediante el valor de pH.

5 No obstante, el control del valor de pH a través de sistemas tampón, habituales en el cultivo celular por lo demás, presenta inconvenientes. De este modo, la capacidad de tamponaje, por ejemplo, de TRIS, HEPES y MOPS debido a sus valores de  $pK_a$  por encima de 7 no es suficiente en el intervalo de pH necesario para la fermentación de PUFA. TRIS es además un mal tampón en los intervalos de pH por debajo de 7,5, una amina primaria potencialmente reactiva, y puede participar activamente en las más diversas reacciones biológicas. El tampón fosfato, un tampón  
10 igualmente empleado con frecuencia, tiene la propiedad de precipitar a partir de la disolución en presencia de cationes divalentes, y además es una mala elección en procesos fermentativos, que requieren, o bien consumen fosfato. Debido a su estrecho intervalo de tamponaje, y debido al hecho de ser metabolizado en el transcurso de la fermentación, el tampón acetato es inapropiado. Además, debido a los costes elevados, muchos sistemas tampón alternativos son poco rentables.

15 Por lo tanto, considerando el estado de la técnica, era tarea de la presente invención poner a disposición un procedimiento de cultivo nuevo, sencillo y económico para microorganismos marinos. En este caso se conseguirá una simplificación considerable del control de proceso. Aparte de la eficiencia de costes, el procedimiento posibilitará la obtención de PUFAs altamente puros en rendimiento elevado.

Estos problemas, así como otros no citados explícitamente, pero que se pueden derivar o deducir de los contextos aquí discutidos preliminarmente, se solucionan mediante el objeto que está definido en las reivindicaciones de la presente invención. La presente invención se refiere a un procedimiento para el cultivo de microorganismos de la especie Thraustochytriales, en el que los microorganismos se cultivan en un medio de fermentación que presenta  $CaCO_3$  como medio esencial para la estabilización del valor de pH, que se presenta con un contenido de 3-15 g/l en el medio de fermentación, siendo  $CaCO_3$  un medio esencial para la estabilización del valor de pH si la suma de  
20 diferencias de valores de pH, que se pueden medir con o sin adición de ácidos, - en cada caso con la adición de  $CaCO_3$  según la invención - es menor o igual a 1.

PUFAs preferentes son DHA, DPA y EPA según la invención.

En especial, los microorganismos cultivados en el procedimiento citado anteriormente muestran una producción de más de un 10 %, preferentemente más de un 14 %, y de modo muy especialmente preferente más de un 18 % de  
30 DHA por biomasa seca.

Los microorganismos cultivados en el procedimiento citado anteriormente muestran en especial una producción de más de un 1 %, preferentemente más de un 2 %, y de modo muy especialmente preferente más de un 3 % de DPA por biomasa seca.

35 Mediante aislamiento de PUFAs, que sigue al cultivo, a partir de la biomasa de microorganismos y/o del medio de cultivo, los PUFAs se pueden obtener en rendimiento y pureza elevados.

Además se recurre al empleo de un medio de cultivo que comprende  $CaCO_3$  como medio esencial para la estabilización del valor de pH, que se presenta con un contenido de 3-15 g/l en el medio de cultivo, para el cultivo de microorganismos de la especie Thraustochytriales.

40 En este caso, bajo condiciones según la invención, los microorganismos muestran una producción de más de un 25 % en peso de aceite, preferentemente de más de un 35 % en peso de aceite, y de modo muy especialmente preferente de más de un 45 % en peso de aceite por unidad ponderal de biomasa seca.

Según la invención se entiende por aceite una fracción de al menos un 70 % de lípidos neutros y al menos un 2 % de fosfolípidos, lo que corresponde al espectro de ácidos grasos normal, conocido por el especialista, de Thraustochytriales. En este caso, los lípidos neutros están constituidos por al menos un 80 % de triglicéridos y otros  
45 compuestos, como por ejemplo glicéridos de diacilo, esteroides, etc. Además, la fracción ponderal de triglicéridos está constituida por aproximadamente un 95 % de ácidos grasos y un 5 % de glicerina.

La posibilidad de fermentar un microorganismo marino para la producción de PUFA sin regulación externa de valor de pH, en especial bajo condiciones que posibilitan un crecimiento rápido y un consumo de glucosa elevado, era completamente sorprendente. Precisamente bajo tales condiciones se llega muy rápidamente a una acidificación del medio, que conduce al ajuste del crecimiento, en la fermentación de microorganismos marinos sin correspondiente control de pH (véase ejemplo 1 y Wen, Z.Y. and Chen, F., 2003, Biotechnology Advances 21, 273-294).  
50

5 Sorprendentemente, el procedimiento según la invención no requiere la adición de otros agentes estabilizadores del valor de pH. Según la invención se entiende por agentes estabilizadores de valor de pH tanto la adición de ácido o base de tanques de adición, regulada en dependencia del valor de pH que se ajusta durante el cultivo, como también el empleo de sistemas tampón en el propio medio, aunque los inventores no conozcan procedimientos de cultivo aplicables desde el punto de vista económico bajo empleo de sistemas tampón, como por ejemplo TRIS o tampón fosfato.

10 Según la invención,  $\text{CaCO}_3$  es el medio esencial para la estabilización del valor de pH. A pesar de ello, puede ser que la adición de ácido o base al cultivo bajo determinadas condiciones sea necesaria para el ajuste de un valor de pH. Tal adición está incluida por la invención, en tanto  $\text{CaCO}_3$  siga siendo el agente esencial para la estabilización de pH. A modo de ejemplo, si el valor de pH desciende por debajo de un determinado valor objetivo durante el cultivo debido a crecimiento de microorganismos especialmente rápido, este valor objetivo se puede ajustar a corto plazo mediante adición de ácido o base, sin que ésta adición sea el medio esencial para la regulación del valor de pH.

15 Los conceptos regulación de valor de pH y control de valor de pH, o bien estabilización de valor de pH, se emplean como sinónimos según la invención.

20 El agente esencial sigue siendo  $\text{CaCO}_3$  si la suma de diferencias de valores de pH, que se pueden medir con o sin adición de ácidos - en cada caso con la adición de  $\text{CaCO}_3$  según la invención -, es menor o igual a 1, preferentemente menor o igual a 0,75, de modo especialmente preferente menor o igual a 0,5, de modo muy especialmente preferente menor o igual a 0,2, y en la mayor parte de los casos preferentemente menor o igual a 0,1. Tal adición de ácidos o bases se considera una adición insignificante de ácidos y/o bases según la invención, que está incluida en la invención.

Son preferentes sistemas de cultivo que no requieren empleo de aditivos ácidos y/o básicos.

Además, muchos sistemas tampón alternativos son poco rentables frente al empleo de carbonato de calcio, debido a costes más elevados.

25 La alta eficacia de carbonato de calcio como tampón para el cultivo de microorganismos de la especie *Thraustochytriales* es sorprendente, ya que el dióxido de carbono producido posee sólo una solubilidad limitada en agua, y de este modo la capacidad tampón desciende durante la fermentación.

30 Sorprendentemente, no sólo era posible la fermentación hasta consumo completo de glucosa, además aumentó también la fracción de PUFA en la biomasa significativamente en el caso de empleo del medio estabilizado carbonato de calcio según la invención. Es aún más sorprendente que la utilización de glucosa, y vinculada a la misma la producción de PUFA, se acelera y conduce de este modo a un rendimiento espacio-tiempo elevado.

Hasta la presente invención no había ningún proceso de fermentación conocido para la producción de ácidos grasos n3 en microorganismos de la especie *Thraustochytriales* bajo empleo de un medio de pH estabilizado con carbonato de calcio, pudiéndose prescindir de otros agentes estabilizadores del valor de pH.

35 Según la invención, PUFAs son ácidos grasos de cadena larga poliinsaturados, con una longitud de cadena > C12, con al menos dos dobles enlaces. PUFAs obtenibles conforme al procedimiento según la invención son especialmente ácidos grasos n3 y ácidos grasos n6.

40 Se entiende por ácidos grasos n3 (ácidos grasos omega-3, ácidos grasos  $\omega_3$ ) ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, con una longitud de cadena > C12, con al menos dos o más dobles enlaces, estando constituido el primero de los dobles enlaces entre los átomos de carbono C3 y C4 partiendo del extremo alquilo. Por consiguiente, en el caso de ácidos grasos n6, el primer doble enlace se sitúa entre los átomos de carbono C6 y C7 partiendo del extremo alquilo.

45 Para la producción de PUFAs conforme al procedimiento según la invención entran en consideración microorganismos de la especie *Thraustochytriales* (*Thraustochytriidea*) (Lewis, T. E., Nichols, P. D., McMeekin, T. A., *The Biotechnological Potential of Thraustochytrids*, Marine Biotechnology, 1999, páginas 580-587 y Porter, D. *Phylum Labyrinthulomycota* en *Handbook of protoctista: the structure, cultivation, habitats and life histories of the eukariotic microorganisms and their descendants exclusive of animals, plants and fungi: a guide to the algae, ciliates, foraminifera, sporozoa, water molds, and other protoctists*. Editores: Margulis, L, Corliss, J. O., Melkonian, M. and Chapman, D. J. editorial coordinator, McK-hann, H. I., Jones and Bartlett Publishers, ISBN 0-86720-052-9 1990, páginas 388-398). Son especialmente preferentes microorganismos de las especies *Japonochytrium*, *Schizochytrium*, *Thraustochytrium* *Althornia*, *Labyrinthuloides*, *Aplanochytrium* y *Ulkenia*. En este caso son muy especialmente preferentes *Schizochytrium*, *Thraustochytrium* y *Ulkenia*. Son especialmente preferentes: *Japonochytrium* sp. ATCC 28207, *Thraustochytrium aureum* (en especial ATCC 28211, o bien ATCC 34304),

## ES 2 387 305 T3

*Thraustochytrium roseum* ATCC 28210, *Thraustochytrium* sp. ATCC 20890, ATCC 20891, ATCC 20892 y ATCC 26185, *Schizochytrium aggregatum* ATCC 28209, *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 y ATCC 20889, *Schizochytrium* SR21, así como *Ulkenia spec.* SAM 2179 y SAM 2180.

5 Microorganismos apropiados para el procedimiento según la invención son tanto formas de tipo salvaje, como también mutantes, y cepas derivadas de los mismos, así como cepas recombinantes de los correspondientes organismos. En medida especial la invención comprende mutantes o cepas recombinantes para el aumento de producción de PUFA.

Los microorganismos se cultivan mediante inoculado de un medio líquido o sólido con un cultivo previo de estos organismos.

10 Técnicas de cultivo apropiadas para microorganismos de la especie *Thraustochytriales* son convenientemente conocidas por el especialista. Típica, pero no exclusivamente, el cultivo se lleva a cabo por medio de fermentación acuosa en un correspondiente depósito. Los ejemplos de depósitos típicos para tal fermentación comprenden matraces vibratorios o bio-reactores, como por ejemplo STRs (stirred tank reactors) o columnas de burbujas. El cultivo se lleva a cabo típicamente a temperaturas entre 10°C y 40°C, preferentemente entre 20°C y 35°C, de modo  
15 especialmente preferente entre 25°C y 30°C, de modo muy especialmente preferente entre 27°C y 29°C, y en especial a  $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$ .

En el ámbito de la presente invención, el contenido en carbonato de calcio del medio estabilizante de valor de pH corresponde a un valor en el intervalo de 3g/L a 15 g/L, preferentemente de 4 g/L a 12 g/L, y de modo especialmente preferente de 5 g/L a 10 g/L. Es muy especialmente preferente un contenido en carbonato de calcio de  $7,5 \pm 0,5$  g/L.

20 El medio con valor de pH estabilizado comprende además, preferentemente, una o varias fuentes de carbono, así como una o varias fuentes de nitrógeno. Para el especialista son convenientemente conocidas substancias empleables como fuentes de carbono y nitrógeno para el cultivo de microorganismos de la especie *Thraustochytriales*.

25 Fuentes de carbono empleables son, a modo de ejemplo, hidratos de carbono, como glucosa, fructosa, xilosa, sacarosa, maltosa, almidón soluble, fucosa, glucosamina, dextrano, ácido glutámico, melaza, glicerina o manitol, o también grasas y aceites, o hidrolizados vegetales.

30 Fuentes de nitrógeno naturales empleables son, a modo de ejemplo, peptona, extracto de levadura, extracto de malta, extracto de carne, aminoácidos casaminoácidos, agua viva de maíz o habas de soja, fuentes de nitrógeno orgánicas empleables son, a modo de ejemplo, glutamato y urea, pero también se pueden emplear fuentes de nitrógeno inorgánicas, como por ejemplo acetato amónico, hidrogenocarbonato amónico, sulfato amónico o nitrato amónico.

35 El medio con valor de pH estabilizado puede contener, además de carbonato de calcio, todos los demás componentes útiles para el especialista para el cultivo de microorganismos de la especie *Thraustochytriales*, en especial sales inorgánicas, a modo de ejemplo de Ca, Mg, Na, K, Fe, Ni, Co, Cu, Mn, Mo o Zn. A modo de ejemplo citense fosfatos, como dihidrogenofosfato potásico, o cloruros, como cloruro de magnesio, sulfatos, como sulfato amónico, sulfato de magnesio, sulfato de hierro o sulfato sódico. Otras sales inorgánicas empleables son, a modo de ejemplo, halogenuros, como bromuro potásico o yoduro potásico, e igualmente otros carbonatos, como por ejemplo hidrogenocarbonato sódico.

40 En caso dado, el medio puede comprender macro- y micronutrientes adicionales, como aminoácidos, purinas, pirimidinas, Corn Steep Liquor (agua viva de maíz), hidrolizados proteicos, vitaminas (hidrosolubles y/o insolubles en agua), y otros componentes del medio convenientemente conocidos por el especialista. Se pueden añadir agentes antiespumantes en caso necesario. El medio puede contener componentes complejos o estar definido químicamente.

45 La cantidad de componentes aislados puede variar en tanto no se presente un efecto negativo sobre el crecimiento o la productividad de microorganismos. El especialista puede determinar fácilmente la composición en el caso aislado correspondientemente a las necesidades del microorganismo. En general se añade la fuente de carbono en una concentración hasta 300 g/l y la fuente de nitrógeno en una concentración de 1 a 30 g/l. El contenido en nitrógeno se ajusta preferentemente en dependencia del contenido de carbono del medio.

50 Un medio con valor de pH estabilizado puede contener glucosa, extracto de levadura, agua viva de maíz (Corn Steep Liquor [CSL]), cloruro de magnesio, carbonato de calcio, cloruro de calcio, sulfato sódico y fosfato potásico.

## ES 2 387 305 T3

El valor de pH del medio se ajusta al comienzo de la fermentación a un intervalo de 3 a 10, preferentemente 4 a 8, de modo especialmente preferente 5 a 7, y de modo muy especialmente preferente aproximadamente 6, mediante adición de un correspondiente ácido o hidróxido.

5 A continuación se esteriliza el medio. Técnicas para la esterilización de medios son convenientemente conocidas por el especialista, a modo de ejemplo cítense tratamiento en autoclave y esterilización por filtración.

El cultivo se puede efectuar en régimen discontinuo, de alimentación discontinua o continuo, como es conocido generalmente por el especialista.

Un cultivo discontinuo o de alimentación discontinua se efectúa habitualmente durante 1 a 12 días, preferentemente 1 a 10 días, de modo especialmente preferente 3 a 9 días.

10 Los componentes de medio se pueden añadir al medio por separado o mezclados, también es concebible una mezcla elaborada previamente. Los componentes, en especial la(s) fuente(s) de carbono y nitrógeno, o determinados aditivos al medio, se pueden añadir antes o durante el cultivo. La adición se puede efectuar una vez, o reiteradamente, o también de manera continua.

15 Los PUFA producidos se presentan en general en forma de grasas neutras, por ejemplo como glicéridos de triacilo o lípidos polares, como por ejemplo fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina o fosfatidilinositol.

20 Para los fines de la presente invención, bajo los conceptos PUFA, ácidos grasos n3 o productos activos n3, se entiende todas las posibles formas en las que se pueden presentar los correspondientes ácidos grasos, es decir, tanto como ácidos grasos libres, ésteres, triglicéridos, fosfolípidos, u otros derivados. Todas estas sustancias se reúnen a continuación, y los conceptos se emplean como sinónimos. Por lo demás, los PUFAs se pueden hacer reaccionar mediante transesterificado químico o biocatalítico, a modo de ejemplo con ayuda de enzimas apropiados (lipasas), y concentrar, antes o después del aislamiento a partir del cultivo.

25 El aislamiento de PUFAs a partir de los microorganismos fermentados, o bien del medio, y el análisis del espectro de ácido graso se efectúa según procedimientos conocidos y habituales para el especialista (Wanasundara, U. N., Wanasundara, J., Shahidi, F., Omega-3 fatty acid concentrates: a review of production technologies, Seafoods-Quality, Technology and Nutraceutical Applications, 2002, páginas 157-174).

A continuación se describe el medio de fermentación con pH estabilizado, que motiva el procedimiento según la invención, por medio de algunos ejemplos y ejemplos comparativos. No obstante, el medio de fermentación, así como la invención, no están limitados a estos ejemplos.

30 **Ejemplo 1:** fermentación de *Ulkenia spec.* cepa SAM 2179 para la producción de PUFA en diferentes medios de cultivos con valor de pH estabilizado, exclusivamente mediante diferentes cantidades de  $\text{CaCO}_3$

Se cultivó *Ulkenia spec.* cepa SAM 2179 en matraces Erlenmeyer de 300 ml con un deflector en 50 mL de medio.

Composición de medio:

Medio de fermentación

	glucosa	150 g/L
35	agua viva de maíz	3,75 g/L
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3 g/L
	$\text{Na}_2\text{SO}_4$	1 g/L
	$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	1 g/L
	$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,3 g/L
40	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5 g/L

Adición de  $\text{CaCO}_3$  por matraz de 50 mL:

## ES 2 387 305 T3

	medio 1.1	0 g/L (comparación)
	medio 1.2	1 g/L (comparación)
	medio 1.3	2 g/L (comparación)
	medio 1.4	5 g/L
5	medio 1.5	10 g/L

Se ajusta el valor de pH a 6,0 con NaOH y se trata en autoclave.

Condiciones de cultivo:

Temperatura (°C)	28
Velocidad de agitación (rpm):	150

- 10 Se efectuó la cosecha celular tras 96 horas de cultivo mediante centrifugado. A continuación se liofilizaron las células y se determinó la biomasa seca. Se efectuó disgregación de células y determinación de ácidos grasos mediante tratamiento térmico durante 2 horas en ácido clorhídrico metanólico al 10 % a 60°C (bajo agitación). Los ésteres se analizaron entonces en cromatógrafo de gases para la determinación de la composición de ácidos grasos.
- 15 Tabla 1: parámetros de fermentación en dependencia de la concentración de carbonato de calcio

	CaCO <sub>3</sub> (g/L)	Consumo de glucosa (g/L)	Valor de pH	BTM (g/L)	Area DHA (%)	DHA/BTM (%)	DHA (g/L)	DHA-RZA (g/Lxd)
Medio 1.1	0	43,0	1,85	22,72	48,3	3,35	0,76	0,19
Medio 1.2	1	59,0	2,31	30,32	44,0	4,91	1,49	0,37
Medio 1.3	2	81,7	2,84	38,58	43,9	9,90	3,82	0,96
Medio 1.4	5	108,4	5,02	52,99	44,8	15,72	8,33	2,08
Medio 1.5	10	111,9	4,78	52,32	45,5	13,23	6,92	1,73

BTM: biomasa seca; DHA/BTM: % en peso de DHA (ácido docosahexaenoico) por unidad de peso BTM; g/lxd rendimiento espacio-tiempo en gramo por litro por día; RZA: rendimiento espacio-tiempo; área DHA (%) fracción de DHA en el espectro de ácido graso

- 20 La fermentación de *Ulkenia spec.* SAM 2179 en el medio de fermentación sin suficiente estabilización de pH conduce a una ralentización del consumo de glucosa y al ajuste del crecimiento en el transcurso de la fermentación, debido a un fuerte descenso del valor de pH (véase medio 1.1 - 1.3). Sólo cantidades mayores de tampón CaCO<sub>3</sub> conducen a una estabilización del valor de pH durante el cultivo (medio 1.4 y 1.5). En este caso, con concentración de CaCO<sub>3</sub> creciente se llega también a un consumo de glucosa elevado durante el cultivo. Debido a la estabilización del valor de pH, y al consumo de glucosa elevado relacionado con la misma, se alcanzan valores de biomasa más elevados, y como resultado de los mismos también rendimientos DHA-espacio-tiempo más elevados, que se sitúan en aproximadamente 2g/Lxd bajo las condiciones experimentales indicadas anteriormente.

- 25 **Ejemplo 2:** fermentación de *Ulkenia spec.* cepa SAM 2179 para la producción de PUFA en diferentes medios de cultivos con valor de pH estabilizado, exclusivamente mediante diferentes cantidades de CaCO<sub>3</sub>, hasta limitación de glucosa

Se cultivó *Ulkenia spec.* cepa SAM 2179 en matraces Erlenmeyer de 300 ml con un deflector en 50 mL de medio hasta consumo completo de glucosa.

## ES 2 387 305 T3

Composición de medio:

Medio de fermentación

	glucosa	150 g/L
	agua viva de maíz	3,75 g/L
5	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g/L
	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 g/L
	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1 g/L
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,3 g/L
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 g/L

10 Adición de CaCO<sub>3</sub> por matraz de 50 mL:

medio 1.4	5 g/L
medio 1.5	10 g/L

Se ajusta el valor de pH a 6,0 con NaOH y se trata en autoclave.

Condiciones de cultivo:

15	Temperatura (°C)	28
	Velocidad de agitación (rpm):	150

20 Se efectuó la cosecha celular tras 144,5 horas de cultivo mediante centrifugado. A continuación se liofilizaron las células y se determinó la biomasa seca. Se efectuó disgregación de células y determinación de ácidos grasos mediante tratamiento térmico durante 2 horas en ácido clorhídrico metanólico al 10 % a 60°C (bajo agitación). Los ésteres se analizaron entonces en cromatógrafo de gases para la determinación de la composición de ácidos grasos.

Tabla 2: parámetros de fermentación tras limitación de glucosa

	CaCO <sub>3</sub> (g/L)	Consumo de glucosa (g/L)	Valor de pH	BTM (g/L)	Area DHA (%)	DHA/BTM (%)	DHA (g/L)	DHA-RZA (g/Lxd)
Medio 1.4	5	150,0	6,49	58,52	47,7	22,20	12,99	2,14
Medio 1.5	10	150,0	6,58	64,65	46,7	20,54	13,28	2,19

25 La fermentación de *Ulkenia spec.* SAM 2179 en medio tamponado con 5 g/L, o bien 10 g/L de CaCO<sub>3</sub>, posibilita un cultivo hasta limitación de glucosa, sin fuerte reducción del valor de pH. La biomasa alcanzable en este caso y la fracción de DHA por biomasa son, con aproximadamente 58-64 g/L de biomasa y un 20-22 % de DHA/BTM, muy elevadas correspondientemente al consumo completo de glucosa. En este caso se muestra que la concentración de CaCO<sub>3</sub> más elevada (10 g/L) conduce a una mayor biomasa, pero la fracción de PUFA DHA esencial por biomasa desciende en cierta medida frente a la concentración más reducida de CaCO<sub>3</sub> (5 g/L). Sin embargo, el rendimiento espacio-tiempo en DHA conseguido en este caso sigue siendo aproximadamente igual a ambas concentraciones.

30 **Ejemplo 3:** cultivo de *Ulkenia spec.* cepa SAM 2179 para la producción de PUFA bajo condiciones de fermentación optimizadas

## ES 2 387 305 T3

Se cultivó *Ulkenia spec.* cepa SAM 2179 en matraces Erlenmeyer de 300 ml con un deflector en 50 mL de medio hasta consumo completo de glucosa. La optimización de la fermentación resultó de una concentración de  $\text{CaCO}_3$  de 7,5 g/L y un cultivo previo modificado. Para el cultivo previo, en lugar de un cultivo estático en medio DH1 se empleó un cultivo agitado con el mismo medio (48 h, 150 rpm y 28°C).

5 Composición de medio:

Medio de cultivo previo: medio DH1

monohidrato de glucosa (g/l):	56,25
extracto de levadura (g/l):	12,5 [Difco]
Tropic Marin (g/l):	16,65 [Dr. Biener GmbH, Wartenberg, Alemania]

10 valor de pH ajustado a 6,0 con HCl

Medio de fermentación:

glucosa	150 g/L
agua de manantial de maíz	3,75 g/L
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3 g/L
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	1 g/L
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1 g/L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,3 g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5 g/L

15 Adición de  $\text{CaCO}_3$  por matraz de 50 mL: medio 1.6 7,5 g/L

20 Se ajusta valor de pH a 6,0 con NaOH y se trata en autoclave.

Condiciones de cultivo:

Temperatura (°C):	28
Velocidad de agitación (rpm):	150

25 Se efectuó la cosecha celular tras 99,75 horas de cultivo mediante centrifugado. A continuación se liofilizaron las células y se determinó la biomasa seca. Se efectuó disgregación de células y determinación de ácidos grasos mediante tratamiento térmico durante 2 horas en ácido clorhídrico metanólico al 10 % a 60°C (bajo agitación). Los ésteres se analizaron entonces en cromatógrafo de gases para la determinación de la composición de ácidos grasos.

Tabla 3: parámetros de fermentación bajo condiciones tampón optimizadas

	CaCO <sub>3</sub> (g/L)	Consumo de glucosa (g/L)	Valor de pH	BTM (g/L)	Area DHA (%)	DHA/BTM (%)	DHA (g/L)	DHA-RZA (g/Lxd)
Medio 1.6	7,5	150,0	6,76	63,84	44,1	23,06	14,72	3,54

30

Mediante el empleo de condiciones de fermentación optimizadas, en las que se cultivó *Ulkenia spec.* SAM 2179 en primer lugar 48 h a 28°C y 150 rpm en medio DH1, el rendimiento espacio-tiempo en DHA se pudo mejorar considerablemente a más de 3,5 g/Lxd. Esto resulta en primer término de un crecimiento más rápido, consiguiéndose la limitación de glucosa en menos de 100 h. El empleo de 7,5 g/L de CaCO<sub>3</sub> en el medio de fermentación posibilita una estabilización de pH necesaria para el cultivo óptimo. El empleo de 7,5 g de CaCO<sub>3</sub> se infirió de los resultados del ejemplo 2, en los que 10 g/L de CaCO<sub>3</sub> dieron por resultado valores de biomasa más elevados, aunque 5 g/L de CaCO<sub>3</sub> condujeron a mejores valores de DHA. Por consiguiente, se supuso una concentración de CaCO<sub>3</sub> óptima para la producción de DHA (es decir, biomasa lo más elevada posible con contenido en DHA lo más elevado posible) entre 5 y 10 g/L de CaCO<sub>3</sub>. Además de la estabilización del valor de pH, el empleo del medio de fermentación descrito conduce a un rendimiento espacio tiempo en DHA sorprendentemente elevado, de más de 3 g/Lxd en el momento de la limitación de glucosa. En este caso se alcanzaron valores de biomasa similares a los del ejemplo 2, pero además la fracción de DHA por biomasa seca y las cantidades de DHA conseguidas (más de un 10 %) eran mayores.

**Ejemplo 4:** fermentación de *Ulkenia spec.* cepa SAM 2179 para la producción de PUFA en medio de cultivo con y sin estabilización de pH a través de CaCO<sub>3</sub>

Se cultivó *Ulkenia spec.* cepa SAM 2179 en un fermentador de 5 L hasta consumo completo de glucosa.

Composición de medio:

Medio de fermentación

	glucosa	150 g/L
20	agua viva de maíz	3,75 g/L
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g/L
	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 g/L
	MgCl <sub>2</sub> x6H <sub>2</sub> O	1 g/L
	CaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O	0,3 g/L
25	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 g/L

Para la fermentación con control de pH: ajuste de valor de pH a 4,0 con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> y tratamiento en autoclave.

Para la fermentación sin control de pH: ajuste de valor de pH a 6,0 con NaOH y tratamiento en autoclave, así como adición de 7,5 g/L de CaCO<sub>3</sub>

Condiciones de cultivo:

30	Temperatura (°C)	28
	Ventilación:	0,8 vvm

Fermentación con y sin control de pH

Tabla 4: parámetros de fermentación con y sin control de pH

Control de pH	CaCO <sub>3</sub> (g/L)	Consumo de glucosa (g/L)	Momento del consumo de glucosa (h)	BTM (g/L)	Area DHA (%)	DHA/BTM (%)	DHA (g/L)	DHA-RZA (g/Lxd)
+	0	150,0	162	66,9	47,2	25,9	17,35	2,5
-	7,5	150,0	150	67,8	46,7	26,9	18,30	2,9

El empleo del medio de fermentación estabilizado mediante  $\text{CaCO}_3$  posibilita un cultivo de *Ulkenia spec.* SAM 2179 hasta limitación de glucosa, sin control de pH, también en a escala de fermentación de 5 L. El empleo de  $\text{CaCO}_3$  en cantidad suficiente conduce a un crecimiento más rápido como consecuencia de un consumo de glucosa acelerado. Además se consigue una biomasa superior. Además, en este contexto se alcanza una fracción de DHA por biomasa acrecentada y mayores cantidades de DHA durante la fermentación. Esto conduce a un aumento considerable del rendimiento espacio-tiempo en DHA de más de un 15 % en el caso de fermentación tamponada con  $\text{CaCO}_3$  frente a fermentación controlada por pH.

5

**Ejemplo 5:** fermentación de *Schizochytrium spec.* SR21 para la producción de PUFA en medio de fermentación 1.6 estabilizado por medio de 7,5 g/L de  $\text{CaCO}_3$

10 Se cultivó *Schizochytrium spec.* Stamm SR21 en matraces Erlenmeyer de 300 ml con un deflector en 50 mL de medio hasta consumo de glucosa completo.

Composición de medio:

medio de cultivo previo: medio GY

	glucosa (g/l):	30,0
15	extracto de levadura (g/l):	10,0 [Difco]
	Tropic Marin (g/l):	16,65 [Dr. Biener GmbH, Wartenberg, Alemania]
		valor de pH ajustado a 6,0 con HCl

Medio de fermentación:

	glucosa	150 g/L
20	agua viva de maíz	3,75 g/L
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3 g/L
	$\text{Na}_2\text{SO}_4$	1 g/L
	$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	1 g/L
	$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,3 g/L
25	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5 g/L

Adición de  $\text{CaCO}_3$  por matraz de 50 mL: medio 1.6 7,5 g/L

Se ajusta valor de pH a 6,0 con NaOH y se trata en autoclave.

Condiciones de cultivo:

	Temperatura (°C):	28
30	Velocidad de agitación (rpm):	150

Se efectuó la cosecha celular tras 96 horas de cultivo mediante centrifugado. A continuación se liofilizaron las células y se determinó la biomasa seca. Se efectuó disgregación de células y determinación de ácidos grasos mediante tratamiento térmico durante 2 horas en ácido clorhídrico metanólico al 10 % a 60°C (bajo agitación). Los ésteres se analizaron entonces en cromatógrafo de gases para la determinación de la composición de ácidos grasos.

35

Tabla 5: parámetros de fermentación bajo condiciones tampón optimizadas

	CaCO <sub>3</sub> (g/L)	Consumo de glucosa (g/L)	Valor de pH	BTM (g/L)	Area DHA (%)	DHA/BTM (%)	DHA (g/L)	DHA-RZA (g/Lxd)
SR 21	7,5	150,0	7,35	66,12	34,4	15,28	10,10	2,52

5 El empleo del medio con pH estabilizado por medio de CaCO<sub>3</sub> descrito en la invención conduce a una optimización de la producción de PUFA también en el caso de otros organismos de Labyrinthulomycota. A modo de ejemplo se puede fermentar el microorganismo *Schizochytrium spec.* cepa SR21 en el medio descrito. El rendimiento espacio-tiempo de PUFA, DHA esenciales en SR 21 es algo menor que en *Ulkenia sp.* SAM 2179 (véase ejemplo 3), pero se sitúa por encima de un 15 % (w/w) de la biomasa seca total, referido a PUFA DHA n-3 esenciales. Este ejemplo muestra que el empleo de medio optimizado con pH estabilizado, que motiva la invención, posibilita una fermentación sin control de pH para la producción de PUFAs también en otros miembros de Labyrinthulomycota.

10

**REIVINDICACIONES**

- 5 1.- Procedimiento para el cultivo de microorganismos de la especie Thraustochytriales, caracterizado porque los microorganismos se cultivan en un medio de fermentación que presenta  $\text{CaCO}_3$  como medio esencial para la estabilización del valor de pH, que se presenta con un contenido de 3-15 g/l en el medio de fermentación, siendo entonces  $\text{CaCO}_3$  un medio esencial para la estabilización del valor de pH si la suma de diferencias de valores de pH, que se pueden medir con o sin adición de ácidos, - en cada caso con la adición de  $\text{CaCO}_3$  según la invención - es menor o igual a 1.
- 10 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, dando los microorganismos una producción de más de un 25, preferentemente de más de un 35, y de modo muy especialmente preferente de más de un 45 % en peso de aceite por unidad ponderal de biomasa seca.
- 3.- Procedimiento según la reivindicación 1, dando los microorganismos una producción de más de un 10, preferentemente de más de un 14, de modo especialmente preferente de más de un 18, y de modo muy especialmente preferente de más de un 22 % en peso de ácido docosahexenoico (DHA) por unidad ponderal de biomasa seca.
- 15 4.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, dando los microorganismos una producción de más de un 1 %, preferentemente más de un 2 %, de modo especialmente preferente más de un 3 %, y de modo muy especialmente preferente de más de un 4 % de ácido docosapentanoico (DHA) por biomasa seca.
- 20 5.- Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, añadiéndose al medio 3 g/L a 15 g/L, preferentemente 4 g/L a 12 g/L, de modo especialmente preferente 5 g/L a 10 g/L, y de modo muy especialmente preferente  $7,5 \pm 0,5$  g/L de  $\text{CaCO}_3$ .
- 6.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el medio comprende glucosa, agua viva de maíz, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, carbonato de calcio, sulfato sódico, sulfato amónico e hidrogenofosfato potásico.
- 25 7.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el medio presenta un valor de pH entre 3 y 10, preferentemente entre 5 y 7.
- 8.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el cultivo se efectúa entre  $10^\circ\text{C}$  y  $40^\circ\text{C}$ , preferentemente entre  $25^\circ\text{C}$  y  $35^\circ\text{C}$ .
- 9.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el cultivo se efectúa durante 1 a 10 días, preferentemente durante 3 a 9 días.
- 30 10.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el microorganismo pertenece a la especie Schizochytrium, Thraustochytrium o Ulkenia.
- 11.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el microorganismo es Ulkenia spec. SAM 2179.
- 35 12.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el microorganismo es Schizochytrium spec. SR 21.
- 13.- Empleo de un medio de cultivo que comprende como agente esencial para la estabilización del valor de pH  $\text{CaCO}_3$ , que se presenta con un contenido de 3-15 g/l en el medio de cultivo, para el cultivo de microorganismos de la especie Thraustochytriales.