(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 399 668**

(21) Número de solicitud: 201031789

(51) Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)
C11B 13/00 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación:

02.12.2010

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

02.04.2013

(56) Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2011/070834

(71) Solicitantes:

UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE (100.0%)
CTRA. DE UTRERA, KM 1
41013 SEVILLA ES

(72) Inventor/es:

MUÑOZ RUIZ, Manuel Jesús y
GUERRERO GÓMEZ, David

(74) Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

(54) Título: **CULTIVO DE BACTERIAS MARINAS EN SUERO LÁCTEO**

(57) Resumen:

La invención se relaciona con el cultivo bacterias marinas en suero lácteo, subproducto de la industria quesera y altamente contaminante y su posterior aprovechamiento como fuente de ácidos grasos poli-insaturados, tal como el ácido docosahexaenoico omega-3 (DHA) producido por dichas bacterias.

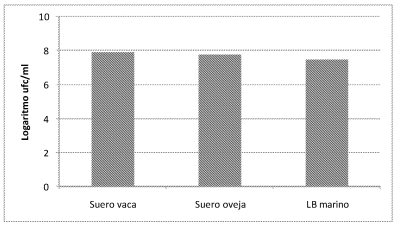

FIGURA 1

ES 2 399 668 A1

DESCRIPCIÓN

CULTIVO DE BACTERIAS MARINAS EN SUERO LÁCTEO

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La invención se relaciona con el cultivo de bacterias marinas en suero lácteo, subproducto de la industria quesera y altamente contaminante y su posterior aprovechamiento como fuente de ácidos grasos, tal como el ácido docosahexaenoico (DHA) producido por dichas bacterias.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Los ácidos grasos, constituyentes de los triacilgliceroles son necesarios para todos los seres vivos, pues no sólo son una fuente de energía, sino que además son fundamentales para el crecimiento, desarrollo y reproducción. Aquellos ácidos grasos que contienen dos o más dobles enlaces se denominan ácidos grasos poli-insaturados (del inglés, PUFA). Los PUFAs son constituyentes de las membranas celulares y forman parte de los sistemas de señalización celular. Su deficiencia puede afectar negativamente la función celular y eventualmente puede conducir a la muerte. En particular, el PUFA de cadena larga de la serie omega 3 (ω3), ácido eicosapentaenoico (C20:5ω3, EPA), ha sido objeto de diversas investigaciones debido a sus efectos beneficiosos observados en los lípidos plasmáticos de personas con cardiomiopatías coronarias, en el cáncer y en la artritis reumatoide. Desde el punto de vista fisiológico, una de las funciones más importantes de los PUFAs es la de ser precursores de los eicosanoides, compuestos de veinte átomos de carbono (C20). Los eicosanoides corresponden a prostaglandinas, prostaciclinas y leucotrienos (Simopoulos, 1991. J. Clin. Nutr. 54: 438-63). Los eicosanoides derivados de los PUFAs omega 6 (ω6) tienen propiedades fisiológicas diferentes a aquellos que se originan de los PUFAs ω3. Las prostaglandinas se sintetizan por medio de la oxidación de los ácidos γ–linolénico (C18:3ω6, GLA), araquidónico (C20:4ω6, ArA) y EPA, los cuales regulan funciones secretoras, digestivas, reproductivas, procesos inmunológicos y de circulación sanguínea. El ácido docosahexaenoico (C22:6ω3, DHA) ha sido reconocido como un componente importante de la leche materna, y contribuye al desarrollo normal del cerebro y del sistema nervioso de los recién nacidos (Nettleton, 1993. J. A. Dietetic Assoc., 93:58-64). Se han sugerido posibles funciones de los PUFAs frente a otros desórdenes (asma, dislexia, depresión, y algunas formas de cáncer), aún cuando se

requiere de mayor evidencia científica. Diversos países, entre los que se incluyen los países escandinavos y Canadá, han establecido valores para el consumo diario de ácidos grasos poli-insaturados ω3. Estas recomendaciones se encuentran en el intervalo de 1 a 1,5 g/ día para adultos.

Distintas investigaciones han demostrado también la esencialidad de los PUFAs ω3, en especial de ArA, EPA y DHA, en la formulación de alimentos empleados en acuicultura (peces y larvas de crustáceos). Actualmente, los aceites de pescado son la principal fuente de ácidos grasos poli-insaturados del tipo ω3, como el EPA y el DHA. Sin embargo, existen algunos problemas al obtener el alimento para peces a partir de los propios peces, tales como la dificultad de obtener productos muy puros y el olor desagradable de dichos productos, así como la baja sostenibilidad ecológica. Se estima que en los próximos años la demanda de PUFA ω3 aumentará debido al crecimiento de la industria acuícola y al incremento en la demanda de PUFAs específicos para la elaboración de suplementos alimenticios para humanos y animales. Fuentes alternativas para la producción de PUFAs ω3 son bacterias, hongos y microalgas.

La síntesis de PUFAs ω3 por bacterias depende no sólo del microorganismo sino también de las condiciones ambientales en las que se desarrolla dicho microorganismo. No obstante, la producción bajo condiciones de crecimiento controladas permite obtener productos consistentes y reproducibles. La producción de PUFAs a través de bacterias es atractiva ya que algunas especies sintetizan un único ácido graso, a diferencia de la compleja mezcla producida por microalgas o acumulada en los peces (Russell *et al.* 1999; Microbiology; 145: 767-79). Entre las bacterias productoras de ácidos grasos poli-insaturados, en particular EPA y DHA, se encuentran las bacterias marinas que pertenecen a los géneros *Shewanella*, *Pseudoalteromonas*, *Colwellia* y *Moritella* (Russell, N. J. & Nichols, D. S. (1999). Microbiology 145, 767-779). Estas especies marinas se encuentran en ambientes donde prevalecen altas presiones y bajas temperaturas.

El suero es un subproducto de la industria láctea que contiene altos niveles de lactosa (4-6% p/v), niveles bajos de compuestos nitrogenados y pequeñas cantidades de vitaminas y minerales (Kim *et al.* 1981. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 13:208-212). Ocasiona serios problemas de contaminación cuando se vierte en el agua y/o en el suelo (Ben-Hassan *et al.* 1994. Appl. Biochem. Biotechnol. 47: 89-105).

Se ha descrito la degradación de suero lácteo por parte de algunos microorganismos, evitándose así la contaminación que provocan los residuos de la industria láctea. Por ejemplo, se ha observado que hongos del género *Aspergillus* son capaces de crecer en suero lácteo (Sánchez-Toro *et al.* Revista Colombiana de Biotecnología, 2004; VI: 43-54), obteniéndose ácido cítrico. Asimismo, se ha descrito la obtención de combustible diesel a partir de bacterias del género *Arthrobacter* (US4368056) creciendo en suero lácteo. En el estado de la técnica también existen artículos que hacen referencia al cultivo de diferentes levaduras para eliminar el problema de contaminación del suero lácteo, tal como *Kluyveromyces marxianus* (Fonseca *et al.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008; 79: 339-54) y una mezcla de *Serratia marcescens* y *Kluyveromyces fragilis* que crecen en suero lácteo con el objetivo de producir proteasas y la reducción de desechos orgánicos (Ustáriz *et al.* 2007; Journal of Applied Microbiology 103: 864-870), así como de otros microorganismos, como *E. coli* recombinante crecido en suero lácteo para generar poli (3-hidroxibutirato) (Ahn *et al.* 2000; Applied and Environmental Microbiology; 6: 3624-3627).

Por tanto, a pesar de que existen algunos microorganismos capaces de degradar el suero lácteo, existe la necesidad de encontrar un mejor aprovechamiento del suero procedente de las industrias lácteas utilizando microorganismos alternativos, a la vez que se producen compuestos de interés, tal como ácidos grasos poli-insaturados, como el DHA.

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

En un aspecto, la invención se relaciona con un método para el cultivo de una bacteria marina que comprende hacer crecer dicha bacteria en un medio de cultivo que comprende suero lácteo, bajo condiciones adecuadas para el crecimiento de dicha bacteria marina.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la producción de al menos un ácido graso que comprende el cultivo de una bacteria marina en un medio de cultivo que comprende suero lácteo bajo condiciones que permiten el crecimiento de dicha bacteria marina y la producción de al menos un ácido graso.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figura 1** describe una gráfica de crecimiento de *Moritella marina*, donde se compara el crecimiento de la bacteria en suero lácteo de oveja, de vaca y en LB, todos ellos suplementados con 3% de NaCl. [ufc: unidades formadoras de colonias].

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Los autores de la presente invención han observado que algunas bacterias marinas son capaces de crecer en suero lácteo. Así, tal y como se ilustra en el Ejemplo 1 para *Moritella marina*, el crecimiento de la bacteria es muy similar en un medio rico, tal como LB y en suero lácteo. Asimismo, la producción de DHA es comparable en ambos medios.

Por tanto, en un primer aspecto, la invención se relaciona con un método (en adelante primer método de la invención) para el cultivo de una bacteria marina que comprende hacer crecer dicha bacteria marina en un medio de cultivo que comprende suero lácteo, bajo condiciones adecuadas.

Una de las ventajas que presenta el primer método de la invención es que se aprovecha el suero lácteo procedente de las industrias lácteas, que es altamente contaminante. Asimismo, mediante el primer método de la invención, además de degradar el suero lácteo, se genera al menos un ácido graso de interés.

El término "bacteria marina", tal como se usa en la presente invención, se refiere a bacterias que habitan en el mar y se encuentran en ambientes donde prevalecen las altas presiones (hasta 110 MPa) y bajas temperaturas (2-4°C). Preferiblemente, dentro de las bacterias marinas, la invención se refiere a bacterias marinas con capacidad proteolítica. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "bacterias marinas con capacidad proteolítica" se refiere a aquellas bacterias marinas que presentan la capacidad de degradar o digerir proteínas, ya sea mediante enzimas específicas, tal como proteasas, o por medio de digestión intramolecular. Ejemplos ilustrativos de bacterias marinas incluyen, aunque no se limitan a, bacterias de los géneros *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Alteromonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chryseomonas*, *Colwellia*, *Corynebacterium*, *Ferrimonas*, *Flavobacterium*, *Glaciecola*, *Halorubrum*, *Idiomarina*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Moritella*, *Proteus*, *Pseudoalteromonas*, *Shewanella*, *Stenotrophomonas*, *Thalassomonas*, y *Vibrio*. Preferiblemente, la bacteria marina con capacidad proteolítica se selecciona entre los géneros *Colwellia*, *Moritella*, *Pseudoalteromonas* y *Shewanella*. Las bacterias de los géneros *Colwellia*, *Moritella*,

Pseudoalteromonas y *Shewanella* pueden presentar alguna modificación genética en su genoma, es decir, se puede utilizar un mutante funcionalmente equivalente de dicha bacteria marina, siempre que mantenga su capacidad de crecer en suero lácteo. Métodos para determinar si la bacteria marina presenta la capacidad de crecer en suero lácteo incluyen, aunque no se limitan a, un método tal como el que se describe en el Ejemplo 1, en el que se crece dicha bacteria en suero lácteo y transcurrido un tiempo determinado por el experto en la materia, se cultiva en un medio sólido y se realiza un contaje de colonias de dicho cultivo, comparando las unidades formadoras de colonias por ml de cultivo entre el tiempo inicial y transcurrido dicho tiempo.

El género *Moritella,* tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a un miembro de la relativamente nueva familia *Moritellaceae* (Ivanova *et al.* 2004; International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54: 1773-88), previamente un género del orden *Alteromonadales*, que cubría otras bacterias Gram-negativas marinas heterotróficas de varios géneros dentro de la clase *Gammaproteobacteria*. Estos géneros incluían *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Shewanella*, *Colwellia*, *Psychromonas*, *Glacicola* y otros. Basándose en el análisis de secuencia del gen del rARN 16S, Ivanova *et al.* propusieron formar nuevas familias con estos géneros, ya que se separaban en diferentes grupos en el árbol filogenético. Esto resultó en nuevas familias que incluían *Moritellaceae, Alteromonadaceae, Pseudoalteromonadaceae, Shewanellaceae* y otras (Ivanova *et al.* 2004, *ad supra*). La especie *Moritella marina* fue la primera que se describió del género *Moritella*, y hasta el momento se han identificado otras seis especies pertenecientes al mismo género: *M. japonica, M. yayanosii, M.viscosa, M.profunda, M.abyssi* y *M. dasanensis*.

El género *Shewanella,* tal como se utiliza en la presente invención, se refiere al único género incluido en la familia de bacterias marinas *Shewanellaceae* (MacDonell & Colwell 1985. Syst Appl Bacteriol 6: 171-182). Actualmente dicho género comprende más de veinte especies. Todas ellas son Gram-negativas, anaerobias y aerobias facultativas asociadas principalmente con hábitats acuáticos. Asimismo, son capaces de producir altas proporciones de ácidos grasos poli-insaturados (Myers *et al.* 1988. Science 240: 1319-1321).

El género *Pseudoalteromonas,* tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a un género de bacterias gran negativas marinas que comprende más de treinta

especies. Se trata de bacterias aerobias o aneróbicas facultativas que son capaces de producir ácidos grasos poli-insaturados.

El género *Colwellia,* tal como se utiliza en la presente invención, incluía originalmente dos bacterias anaerobias facultativas, *Colwellia psychrerythraea* y *C. hadaliensis* (Deming *et al.* 1998. Syst. Appl. Microbiol. 10: 152-60). Posteriormente, en Bowman y col. (Bowman *et al.* 1998. Int. J. Syst. Bacteriol. 48: 1171-80) describieron cuatro nuevas especies psicrofílicas de este género, *C. demingiae*, *C. hornerae*, *C. rossensis* y *C. psychrotropica*, y nuevas cepas de *C. psychrerythraea*. Ninguno de estos aislados antárticos son barofílicos y todos ellos sintetizan DHA en cantidades de hasta un 8 % del contenido total celular de ácidos grasos.

Para la puesta en práctica del primer método de la invención, las bacterias marinas se cultivan bajo condiciones adecuadas que permiten el crecimiento de las bacterias marinas a cultivar.

Por "método para el cultivo", según se usa en la presente invención, se refiere a métodos de crecimiento del microorganismo, en donde se utilizan las condiciones óptimas de crecimiento de cada microorganismo particular. Las condiciones del cultivo (temperatura, concentración de oxígeno, tiempo de cultivo y agitación) son conocidas por el experto en la materia para cada bacteria marina determinada y serán determinadas para cada cultivo. En una realización particular, la temperatura adecuada para el cultivo de las bacterias marinas de los géneros *Moritella, Shewanella*, *Colwellia* y *Pseudoalteromonas* se encuentra entre 10ºC y 25ºC. En una realización preferida el cultivo se lleva a cabo con agitación. En el caso particular de *M. marina*, se obtienen buenos resultados cuando se cultiva a una temperatura comprendida entre 4ºC y 16ºC, más preferiblemente de 16ºC, durante un periodo de tiempo de alrededor de 72h y con agitación; aunque la velocidad de agitación puede variar dentro de un amplio intervalo, en una realización preferida, la velocidad de agitación es de alrededor de 200 rpm. El cultivo se deja crecer hasta que la biomasa bacteriana sea suficiente para el propósito deseado o para recuperar el producto generado por dicha bacteria.

Por "suero lácteo", según se usa en la presente memoria, se refiere a un líquido resultante de la coagulación de la leche de un mamífero durante la elaboración del queso y la caseína, después de la separación de la cuajada o fase micelar. Sus características corresponden a un líquido fluido, de color verdoso amarillento, turbio, de sabor fresco, débilmente dulce y de carácter ácido (pH entre 4,4 y 4,6). La composición media del

suero comprende aproximadamente (en % (p/p)): 40-50% de lactosa, 0,5-10% de proteínas, 0,5-2% de materia grasa y 5-10% de minerales (Modler H.W. 1987. J. Dairy Sci. 70: 766-75). En una realización particular, el suero lácteo es de una hembra de un animal mamífero seleccionada del grupo formado por los siguientes animales: vaca, cabra, oveja, yak, camello, dromedario, burro, caballo, búfalo y llama.

El suero lácteo puede obtenerse comercialmente o puede ser obtenido a partir de la fabricación de queso. En una realización particular, existe una etapa previa de tratamiento del suero, antes del crecimiento de la bacteria en dicho suero, con el fin de eliminar posibles agregados presentes en el suero. Para llevar a cabo esta etapa, se procede a centrifugar el suero o bien se puede llevar a cabo un filtrado. En el caso de que la concentración de sal no sea suficiente para permitir el crecimiento de la bacteria marina, el suero lácteo se puede suplementar añadiendo una sal hasta conseguir una concentración final comprendida entre un 1 y un 4% (p/v), preferiblemente de 3%. Preferiblemente la sal es de un metal alcalino con un halógeno. Más preferiblemente, la sal que se añade para el crecimiento del microorganismo es cloruro sódico (NaCl).

En una realización particular, el suero lácteo se pasteuriza para eliminar microorganismos. Preferiblemente, la pasteurización se lleva a cabo aproximadamente a 80ºC durante 30 segundos. La inoculación de la bacteria marina en el suero lácteo pasteurizado se lleva a cabo en el momento en el que el suero lácteo está a una temperatura adecuada para el crecimiento de la bacteria, que será determinada en cada caso particular por el experto en la materia.

Las bacterias marinas son capaces de producir diferentes ácidos grasos de interés, tal como ácidos grasos poli-insaturados. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la producción de al menos un ácido graso, en adelante segundo método de la invención, que comprende el cultivo de una bacteria marina según el primer método de la invención descrito anteriormente. En una realización particular, el ácido graso es un ácido graso poli-insaturado. Ejemplos de ácidos grasos poli-insaturados que pueden ser producidos por las bacterias marinas cultivadas en suero lácteo incluyen, aunque no se limitan a, los mencionados en la tabla siguiente:

Ácidos grasos omega-3

Nombre común	Nombre ácido graso
Ácido alfa-linoleico (ALA)	18:3 (n-3)
Ácido estearidónico (SDA)	18:4 (n-3)
Ácido eicosatrienoico (ETE)	20:3 (n-3)

Ácido eicosatetraenoico (ETA)	20:4 (n-3)
Ácido eicosapentaenoico (EPA)	20:5 (n-3)
Ácido docosapentaenoico (DPA)	22:5 (n-3)
Ácido docosahexaenoico (DHA)	22:6 (n-3)
Ácido tetracosapentaenoico	24:5 (n-3)
Ácido tetracosahexaenoico	24:6 (n-3)

Ácidos grasos omega-6

Nombre común	Nombre ácido graso
Ácido linoleico	18:2 (n-6)
Ácido gamma linolénico (GLA)	18:3 (n-6)
Ácido eicosadienoico	20:2 (n-6)
Ácido dihomo-gama-linolénico (DGLA)	20:3 (n-6)
Ácido araquidónico (AA)	20:4 (n-6)
Ácido docosadienoico	22:2 (n-6)
Ácido adrénico	22:4 (n-6)
Ácido docosapentaenoico	22:5 (n-6)

Ácidos grasos omega-9

Nombre común	Nombre ácido graso
Ácido oleico	18:1 (n-9)
Ácido eicosenoico	20:1 (n-9)
Ácido Eicosatrienoico	20:3 (n-9)
Ácido erúcico	22:1 (n-9)
Ácido nervónico	24:1 (n-9)

En una realización preferida, el ácido graso poli-insaturado es el ácido docosahexaenoico (DHA).

A partir del segundo método de la invención se pueden generar, además de ácidos grasos poli-insaturados, ácidos grasos saturados de interés. Ejemplos de ácidos grasos saturados incluyen, aunque no se limitan a, ácido mirístico (14:0), ácido palmítico (16:0), ácido esteárico (18:0) y ácido laurico (12:0).

Como entenderá un experto en la materia, existen varios métodos para determinar si se ha generado al menos un ácido graso tras la puesta en práctica del segundo método de la invención. Métodos para determinar la cantidad de ácidos grasos generados incluyen, aunque no se limitan a, métodos de titulación química (mediante titulación por ejemplo con KOH o NaOH o siguiendo el método descrito en Dole VP *et al.*, J Clin Invest 1956, 35, 150 o bien el método descrito en Ke PJ *et al.*, Anal Chim Acta 1978, 99, 387), métodos de titulación termométrica (descrito en Smith TK, J Am

Oil Chem Soc 2003, 80, 21-24), medición de complejos metal-ácido graso (descrito en Ho RJ *et al.*, Anal Biochem 1969, 31, 426-436, para complejos con cobalto), métodos enzimáticos (descrito por ejemplo en Jebens E *et al.* Scand J Clin Lab Invest 1992, 52, 717), métodos que utilizan una proteína de unión a ácidos grasos (tal como los descritos en Spector AA *et al.*, Biochemistry 1971, 10, 3229, Richieri GV *et al.* Biochemistry 1993, 32, 7574 y Richieri GV *et al.*, J Lipid Res 1995, 36, 229), métodos espectroscópicos (Yoshida S, Lipid Technol 2008, 20, 184 y Wu D *et al.*, Anal Chim cta 2009, 634, 166) y métodos cromatográficos (Bligh, E.G. and Dyer, W.J. Can. J. Biochem. Physiol., 37, 911-917 (1959)). El experto en la materia utilizará el método más adecuado para determinar la cantidad de ácidos grasos generados. En una realización preferida, el método para cuantificar los ácidos grasos producidos por la bacteria es el método descrito por Bligh & Dyer (citado *ad supra*), tal como el descrito en el Ejemplo 1.

En una realización particular, la invención se relaciona con un método para la producción de ácido docosahexanoico (DHA) que comprende el cultivo de una bacteria marina en un medio que comprende suero lácteo, según el primer método de la invención. El DHA es producido por las bacterias marinas por una vía biosintética en la que está implicada la poliquétido sintasa (Yu, R. *et al.* 2000; Lipids 35:1061-1064). Las bacterias marinas producen DHA cuando se cultivan en condiciones adecuadas, que son determinadas por el experto en la materia para cada bacteria marina en particular.

Preferiblemente la bacteria marina utilizada en el segundo método de la invención se selecciona entre los géneros *Moritella*, *Shewanella*, *Colwellia* y *Pseudoalteromonas*. En una realización aún más preferida, la bacteria es *Moritella marina*.

Las etapas del segundo método de la invención coinciden con las etapas del primer método de la invención con respecto al crecimiento de la bacteria marina en suero lácteo y por tanto, se hace referencia a ellas en esta sección, así como a las definiciones empleadas en el primer método de la invención. Una vez que se ha cultivado la bacteria marina en las condiciones adecuadas, y se ha producido el ácido graso de interés, opcionalmente se puede purificar la fracción lipídica del cultivo para finalmente aislar el ácido graso concreto de dicha fracción. La purificación de los lípidos puede realizarse mediante cualquier método convencional apropiado conocido por el experto en la materia. Uno de los métodos convencionales utilizado para la

purificación de la fracción lipídica es el protocolo descrito en Lewis T *et al.* (J Microbiol Meth 2000, 43, 107). En una realización particular, el método de purificación comprende las siguientes etapas; en primer lugar, se recogen las bacterias del cultivo por métodos convencionales, tales como centrifugación, filtración, etc. Dichas bacterias se lavan con agua o con un buffer, según lo más adecuado y se resuspenden en un medio líquido, que decidirá el experto en la materia. Posteriormente se lleva a cabo una extracción con un disolvente utilizado de manera habitual para la extracción de lípidos, tal como una mezcla de cloroformo/metanol, y se separa la fase de cloroformo. Finalmente, se evapora el cloroformo para obtener el material que contiene el ácido graso deseado, tal como el DHA, entre otros ácidos grasos. Posteriormente, si se desea, se puede proceder a aislar el ácido graso deseado del resto de los lípidos, por ejemplo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), así como mediante otras cromatografías u otras técnicas que son conocidas por el experto en la materia.

El medio de cultivo que comprende suero lácteo puede incluir en su composición algún aditivo para que se genere una mayor cantidad del ácido graso de interés, tal como la cerulenina. La cerulenina es un antibiótico antifúngico, inhibidor de la biosíntesis de ácidos grasos y de esteroides que, sin embargo, potencia la producción de DHA en bacterias (incluyendo las bacterias marinas), aumentando entre un 5 y un 20% la cantidad de DHA final producida (Morita N *et al.* Biotechnology Letters, 27: 389-393).

El siguiente Ejemplo ilustra la invención y no debe ser considerado en sentido limitativo de la misma.

EJEMPLO 1

Crecimiento de *Moritella marina* en suero lácteo

Previamente al crecimiento de *M. marina* en suero lácteo, la bacteria se creció en un medio sólido comprendiendo LB (Luria-Bertani) marino a 16°C. El suero lácteo de oveja utilizado presentaba una composición (por 100 g de suero lácteo) de 1,6 g de grasa, 1,7 g de proteína y 4,9 g de lactosa. La cantidad de cloruro sódico (NaCl) era de alrededor del 1% (p/p). Asimismo, se utilizó también suero lácteo procedente de vaca, cuya composición era muy similar a la del suero de oveja. La muestra de suero lácteo se centrifugó con el fin de eliminar agregados presentes en dicho suero, posteriormente se añadió NaCl hasta una concentración final del 3% (30 g/l). A continuación se pasteurizó

el suero lácteo, calentándolo en un bote de vidrio hasta 80ºC en un baño de agua durante 30 segundos e inmediatamente se enfrió en un baño a 4ºC. Posteriormente, cuando la muestra se encontraba entre 4ºC y 16ºC (temperatura de crecimiento de *M. marina*), se inoculó la bacteria crecida en placa en 500 ml de suero lácteo suplementado con NaCl. Se cultivó durante 72 horas a una temperatura de 16ºC y con una agitación de 200 rpm. Para observar el crecimiento de *M. marina* en suero lácteo, una vez pasado el tiempo, se creció dicho cultivo en una placa de LB marino a 16ºC y se realizó un contaje de colonias. Se llevó a cabo también el crecimiento de *M. marina* en medio LB marino a 16ºC durante 72 horas y se utilizó como control de crecimiento de *M. marina*.

En la Figura 1 se puede observar que el crecimiento de *M. marina* es muy similar en medio LB marino y en suero lácteo de oveja y vaca, llegando en ambos casos a un número muy similar de unidades formadoras de colonias (ufc) por ml.

En cuanto a la determinación de la producción de ácidos grasos, una vez crecida la bacteria, se procedió a centrifugar el cultivo y a resuspender el precipitado de bacterias en un tampón adecuado. Finalmente, se siguió el protocolo de extracción de lípidos según el método Bligh & Dyer (citado *ad supra*), en el que se añadieron 3,75 ml de 1:2 (v/v) $CHCl_3$: metanol y se agitó, luego se añadieron 1,25 ml de $CHCl_3$, y se agitó nuevamente, añadiendo finalmente 1,25 ml de H_2O. Se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y se recuperó la fase inferior. A continuación, para determinar la composición de ácidos grasos, el extracto de lípidos obtenido se transmetiló para su posterior análisis mediante cromatografía de gases, añadiendo 1 ml de H_2SO_2 al 2,5% diluido en metanol e incubándolo 1 hora a 80ºC. Una vez frío, se añadieron 0,2 ml de hexano y 1,5 ml de H_2O, se centrifugó a baja velocidad recuperando la fase superior para su posterior análisis mediante cromatografía de gases.

Como controles, se conoce que la cantidad de ácidos grasos en un medio LB marino en el que no ha crecido ningún microorganismo es cercana a 0, ya que únicamente presenta triptona (conjunto de péptidos formados por la digestión de caseína) y extracto de levadura (8 a 12% de contenido nitrogenado, 50 a 75% de contenido proteico y 4 a 13% de carbohidratos). En cuanto a la cantidad de ácidos grasos poli-insaturados en el suero lácteo en el que no ha crecido ningún microorganismo es también cercana a 0, en concreto, entre 0,03-0,06% de DHA y entre 0,04-0,05% de EPA (Chilliard *et al.* 2000. Ann. Zootech. 49:181-205).

Como se puede observar en la Tabla 1, la producción de ácidos grasos por *M. marina* es similar cuando se crece en LB marino y en suero lácteo. La cantidad de algunos ácidos grasos obtenidos tras el crecimiento de *M. marina* en suero lácteo es incluso superior a la cantidad obtenida en LB, en concreto para los siguientes ácidos grasos: ácido mirístico (14:0), ácido palmítico (16:0), ácido esteárico (18:0), ácido oleico (18:1n9, omega 9), ácido oleico con un doble enlace en la posición 7 (18:1n7), ácido linoleico (18:2n6), ácido eicosatrienoico (20:3n6) y ácido docosapentaenoico (20:5n3).

La cantidad de DHA (22:6) obtenido por el crecimiento de *M. marina* en suero es algo menor que la obtenida cuando se crece en LB marino. Esto es debido posiblemente a que el suero presenta otros ácidos grasos y los niveles de DHA se pueden diluir en el total de ácidos grasos. Sin embargo, esta cantidad es similar a la obtenida a partir de otros microorganismos, tales como *Nitzschia*, *Saprolegnia* y *Pythium*. Por otro lado, normalmente la dieta para el cultivo de muchas especies marinas de peces requiere alrededor del 1 al 2% de ácidos grasos poli-insaturados (Rees *et al.* 1994. Aquaculture 122: 193-207), por lo que la cantidad obtenida cultivando *M. marina* en suero lácteo es suficiente para cubrir estas necesidades. Asimismo, el DHA obtenido podría tener también como destino el consumo humano, ya que se puede comercializar aislado o añadir a los alimentos.

ÁCIDO GRASO	**SUERO LÁCTEO**	**LB**
14:0	6,92	4,28
14:1	0,69	1,51
16:0 iso	0	0
16:0	25,9	13,6
16:1n7	4,63	55,71
17:0 iso	0	0
18:0	14,12	0,38
18:1n9	1,3	0,63
18:1n7	17,49	9,98
18:2n6	5,88	1,07
18:3n6	0	0
19 delta	0	0
20:3n6	0,54	0
20:4n6	0	0
20:4n3	0	0,84

20:5n3	4,24	0,5
22:6	4,84	9,21

Tabla 1: Comparación de la producción de ácidos grasos para *M. marina* crecida en suero lácteo y en LB. Representado como porcentaje de cada uno de los ácidos grasos con respecto al total de ácidos grasos. [Los ácidos grasos se nombran mediante un primer número que corresponde al número de átomos de carbono en la molécula y un segundo número que corresponde al número de dobles enlaces. Los ácidos grasos omega 3, omega 6 y omega 9 se representan como n3, n6 y n9, respectivamente].

Asimismo, la producción de ácidos grasos se puede incrementar añadiendo cerulenina (Nomura *et al.* J Biochem. 1972; 71(5):783-96). Así, tal como se muestra en la tabla 2, al añadir cerulenina a un medio que contiene LB marino, se incrementa la producción de ácidos grasos, tanto saturados como insaturados. De la misma manera, cuando se añade cerulenina a un medio que comprende suero lácteo, también se potencia la producción de ácidos grasos.

	14:0	14:1	16:0 iso	16:0	16:1n	17iso	18:0	18:1n9	18:1n7	18:2n6	18:3n6	19 delta	20:3n6	20:4n6	20:4n3	20:5n3	25:0	22:6	
LB	4,28	1,51	0	13,6	55,71	0	0,38	0,63	9,98	1,07	0	0	0	0	0,84	0,5	0	9,21	**16ºC**
LB + cerulenina	15,4	5,88	0	16,71	30,7	0	0,26	0,77	0	0	0	0	0	0	1,27	1,04		22,5	**16ºC**

Tabla 2: Comparación de la concentración de ácidos grasos (% respecto al total de ácidos grasos) presentes en *M. marina* crecida en LB (fila 1) y en LB con cerulenina (fila 2).
[Los ácidos grasos están nombrados mediante números, el primero indica el número total de carbonos, el segundo seguido de dos puntos el número de dobles enlaces y el *nx* indica la posición del primer doble enlace]

REIVINDICACIONES

1. Método para el cultivo de una bacteria marina que comprende hacer crecer dicha bacteria en un medio de cultivo que comprende suero lácteo, bajo condiciones adecuadas para el crecimiento de dicha bacteria marina, en donde dicha bacteria marina es una bacteria del género *Moritella*.
2. Método según la reivindicación 1, en donde la bacteria marina presenta capacidad proteolítica.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde la bacteria marina es *Moritella marina*.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la bacteria marina presenta la capacidad de generar al menos un ácido graso.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el ácido graso es un ácido graso poli-insaturado.
6. Método según la reivindicación 5, en donde el ácido graso poli-insaturado es ácido docosahexanoico (DHA).
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el medio de cultivo comprende NaCl.
8. Método según la reivindicación 7, en donde el medio de cultivo comprende entre 1 y 4% (p/v) de NaCl.
9. Método según la reivindicación 8, en donde el suero lácteo es un suero lácteo procedente de un mamífero seleccionado entre una hembra de vaca, cabra, oveja, yak, camello, dromedario, burro, caballo, búfalo y llama.
10. Método para la producción de al menos un ácido graso que comprende el cultivo de una bacteria marina en un medio de cultivo que comprende suero lácteo bajo condiciones que permiten el crecimiento de dicha bacteria marina y la producción de al menos un ácido graso, en donde dicha bacteria marina es una bacteria del género *Moritella*.
11. Método según la reivindicación 10, en donde el ácido graso es un ácido graso poli-insaturado.
12. Método según la reivindicación 11, en donde el ácido graso poli-insaturado es ácido docosahexanoico (DHA).

13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en donde la bacteria marina es *Moritella marina*.
14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en donde, además, se extrae la fracción lipídica.

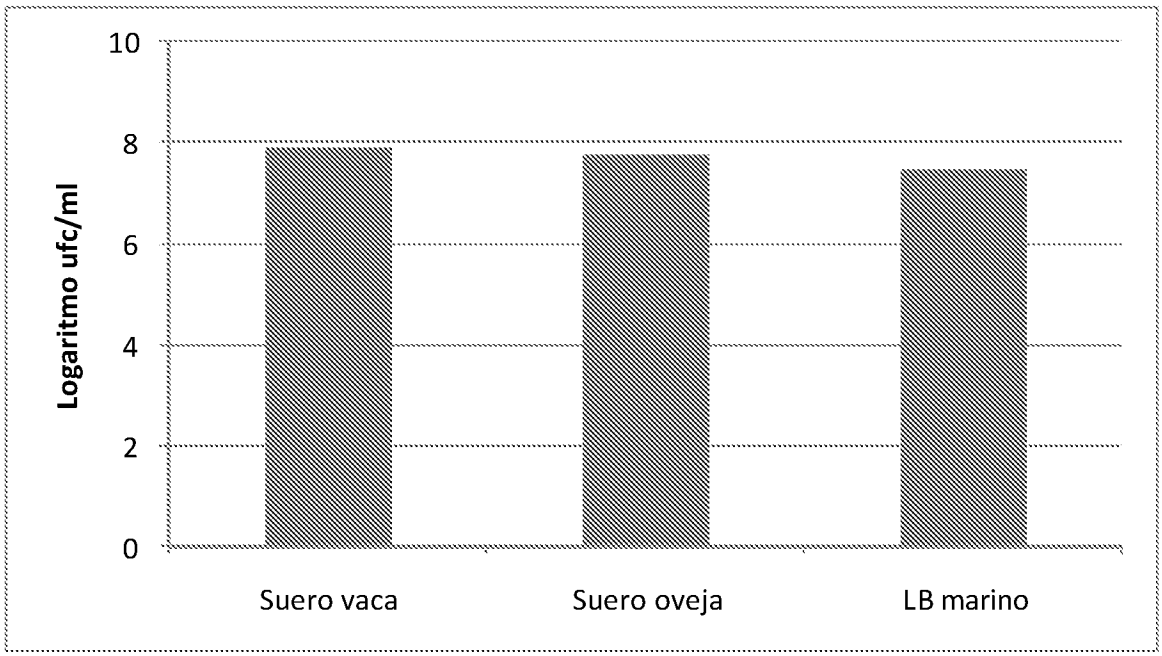

FIGURA 1