

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 076**

51 Int. Cl.:

C12P 7/64 (2006.01)

A23K 1/00 (2006.01)

A23K 1/16 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.08.2007 E 07790064 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2013 EP 2179046**

54 Título: **Sobreproducción de ácido dihomo-gamma linolénico por una cepa mutante de *Parietochloris incisa***

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.04.2013

73 Titular/es:

**BEN-GURION UNIVERSITY OF THE NEGEV
RESEARCH AND DEVELOPMENT AUTHORITY
(100.0%)
P.O.Box 653
84105 Beer-sheva, IL**

72 Inventor/es:

**COHEN, ZVI;
KHOZIN-GOLDBERG, INNA;
BOUSSIBA, SAMMY y
VONSHAK, AVIGAD**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 402 076 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).

DESCRIPCIÓN

Sobreproducción de ácido dihomo-gamma linolénico por una cepa mutante de *Parietochloris incisa*

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a la cepa mutante de *Parietochloris incisa* que tiene N.º de Acceso ATCC PTA-8497 y a un procedimiento para la producción de ácido dihomo-gamma linolénico (DGLA) a partir de dicha microalga. Más específicamente, el procedimiento incluye el cultivo de dicha microalga rica en ácido araquidónico que ha perdido o ha reducido significativamente su capacidad para la desaturación de DELTA 5.

Antecedentes de la invención

10 DGLA es un ácido graso industrialmente importante que puede usarse para las aplicaciones farmacéuticas y nutricionales, en alimentación para acuicultura y para animales y para potenciar sus sistemas inmunológicos reduciendo de este modo su mortalidad y morbilidad debido al estrés y las enfermedades. DGLA, también conocido como ácido 8,11,14-eicosatrienoico, se encuentra solamente en microorganismos y siempre en porcentajes bajos. Usualmente, sirve como un intermedio en la biosíntesis de ácido araquidónico (AA, 20:4 ω 6), facilitándose la conversión de DGLA a AA por la enzima Δ 5 desaturasa.

15 Las microalgas son una fuente de productos bioquímicos "verde" y renovable. Se pueden cultivar fototróficamente o adaptarse, o manipularse para crecimiento en condiciones heterótrofas.

El alga de agua dulce *Parietochloris incisa* es la fuente vegetal más rica del ácido graso poliinsaturado (PUFA) AA.

En condiciones de ausencia de nitrógeno, el contenido de AA puede alcanzar el 21 % de peso seco.

20 Los aceites vegetales son capaces de producir diversos PUFA. Sin embargo, aquellos producidos por plantas superiores están restringidos a cadenas de hasta 18 átomos de carbono. Las microalgas por otro lado, se conocen por producir PUFA de hasta 22 átomos de carbono de largo.

25 Tanto AA como DGLA son PUFA de interés farmacológico significativo. DGLA se encuentra en muchos organismos como un intermedio; sin embargo, hay pocos organismos huéspedes naturales en los que hay acumulación de cantidades significativas de este PUFA. Posiblemente la única fuente tal es el mutante deficiente en Δ 5 desaturasa del hongo *Mortierella* (documento US 6.602.690). Sin embargo, un inconveniente asociado con los PUFA producidos por este mutante fúngico es la proporción DGLA/AA desfavorablemente baja (aproximadamente 12). Una desventaja adicional de los PUFA derivados de hongos es que son susceptibles a oxidación y es necesario que se añadan antioxidantes sintéticos para evitar deterioro por oxidación. Dado que la oxidación es una reacción en cadena, incluso una cantidad pequeña de oxígeno puede destruir PUFA rápidamente.

30 Existe así una necesidad de una fuente natural, "verde" de DGLA que supere los problemas anteriormente mencionados.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona

35 una cepa mutante de *Parietochloris incisa* caracterizada porque comprende una concentración sustancialmente reducida de ácido araquidónico (AA) conjuntamente con una concentración intracelular sustancialmente incrementada de ácido dihomo-gamma linolénico 20:3 ω 6 (DGLA), en el que dicha cepa es la cepa IKG-1, que tiene N.º de Acceso de ATCC PTA-8497. También se proporciona un procedimiento para producir DGLA, que comprende incubar la cepa mutante de la microalga *Parietochloris incisa* que es defectiva en su gen de la Δ 5 desaturasa (Δ 5D) y recuperar lípidos que contienen DGLA de la misma. En un procedimiento preferido de la invención, la proporción de DGLA a AA (en una base en peso) en el producto final (es decir, en los lípidos que contienen DGLA) es mayor de 25. En una realización particularmente preferida, esta proporción es mayor de 50.

45 Como una guía general, la frase "concentración intracelular de AA sustancialmente reducida", como se usa en el presente documento se tomaría para querer decir que dicha concentración es aproximadamente el 1 % de los ácidos grasos totales o menos. De forma similar, la frase "concentración intracelular sustancialmente incrementada de DGLA" se refiere a una concentración de DGLA mayor de aproximadamente el 30 % de los ácidos grasos totales.

Se contempla que, la concentración intracelular de AA es menor del 0,1 % (p/p), mientras que la concentración intracelular de DGLA es al menos el 30 % (p/p). Ambas de las concentraciones en % p/p mencionadas anteriormente son para entenderse como que se refieren al porcentaje de la sustancia indicada en relación con los ácidos grasos celulares totales.

50 La cepa de *Parietochloris incisa* mutante mencionada anteriormente es una cepa que es defectiva en su gen de la Δ 5 desaturasa (Δ 5D). El término "defectiva" se usa en este contexto para hacer referencia al hecho de que el gen de la Δ 5 desaturasa (Δ 5D) bien está ausente o bien tiene sustancialmente menos actividad desaturasa que el gen de tipo

silvestre debido a una mutación puntual (por ejemplo una sustitución, inserción o delección de una base de ácido nucleico individual) o a una mutación más grande (por ejemplo una inversión o reordenamiento de una secuencia).

La presente invención se refiere particularmente a la cepa mutante IKG-1 de *Parietochloris incisa*, que se depositó con el N.º de Acceso PTA-8497 en la American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, Virginia, EE.UU., en los términos del Tratado de Budapest.

Se describe un lípido que contiene DGLA, en el que la proporción de DGLA frente a ácido araquidónico es al menos 25 partes en peso. En otro aspecto descrito, la concentración de DGLA en dicho lípido que contiene DGLA es al menos el 30 % (p/p), al menos el 90 % (p/p) de los lípidos totales en dicho lípido que contiene DGLA son triacilgliceroles.

Se describe adicionalmente un precursor E1 de prostaglandinas de origen en las algas. Dicho precursor de prostaglandina E1 se puede obtener a partir de la cepa mutante de *Parietochloris incisa*, como se caracteriza anteriormente.

Cabe señalar que el término "precursor de prostaglandina E1" se usa en este contexto para hacer referencia a cualquier ácido graso o mezcla de ácidos grasos que puede servir como un material de partida o intermedio en la síntesis de AA. Ejemplos de tales ácidos grasos incluyen GLA y DGLA.

Se describen composiciones que comprenden lípidos que contienen DGLA y/o precursores de prostaglandina E1, todos los cuales se caracterizan como se describe anteriormente. Tales composiciones se pueden preparar para usar en una diversidad de aplicaciones incluyendo alimentos animales, formulaciones para infantes humanos y suplementos alimentarios.

Por ejemplo, la composición puede ser una composición de comida sana que comprende un lípido que contiene DGLA referida al presente documento.

Dicha composición de comida sana se puede usar, entre otras cosas, para aliviar los efectos secundarios experimentados tras ingestión de alcohol.

Descripción detallada

Con el fin de generar cepas mutantes de *P. incisa*, la cepa de tipo silvestre puede exponerse a un agente mutágeno y después plaquearse en un medio sólido a una temperatura baja. Las colonias que demostraron crecimiento disminuido en estas condiciones pueden seleccionarse y analizarse después en su contenido en AA y en DGLA.

Los cultivos de *P. incisa* pueden mutagenizarse por una diversidad de técnicas diferentes que incluyen irradiación (por ejemplo con rayos X o luz ultravioleta), tratamiento con mutágenos químicos (por ejemplo 1-metil-3-nitro-nitrosoguanidina, metanosulfonato y 6-mercaptapurina).

Tras la mutagénesis, las células se plaquearon en placas de agar y se llevaron a una temperatura baja (por ejemplo 15 °C). Las colonias que mostraron crecimiento disminuido pueden después aislarse y analizarse en su contenido lipídico.

Los autores de la presente invención encontraron inesperadamente que una de las colonias seleccionadas como se describe anteriormente demostró ser deficiente en AA. En condiciones de ausencia de nitrógeno la proporción de AA en este mutante fue más baja del 1 % en comparación con más del 50 % en el tipo silvestre. Sin embargo, la proporción de precursor inmediato de AA, DGLA (20:3ω6) se incrementó desde aproximadamente el 1 % hasta por encima del 30 % en el mutante. La proporción de DGLA/AA en los PUFA producidos por el mutante de alga es mayor de 25 y en ciertas circunstancias, mayor de 50, ambas de las cuales proporciones son claramente superiores a la proporción DGLA/AA de 12 asociada con PUFA producidos por el mutante fúngico descrito en la técnica anterior mencionada anteriormente.

En vista de la proporción de DGLA/AA alterada mencionada anteriormente, se puede concluir que la cepa mutante seleccionada es defectiva en gen de la $\Delta 5$ desaturasa ($\Delta 5D$) que desatura DGLA a AA. De forma similar al tipo silvestre, el mutante es capaz de acumular contenidos altos de lípidos, mayoritariamente triacilgliceroles, en ausencia de nitrógeno, permitiendo la aplicación biotecnológica del procedimiento.

El aceite rico en DGLA de mutante de *P. incisa* es superior al aceite fúngico porque contiene β caroteno, un antioxidante natural. Los PUFA fúngicos son susceptibles de oxidación y deben añadirse antioxidantes sintéticos para evitar deterioro por oxidación. Dado que la oxidación es una reacción en cadena, incluso una cantidad pequeña de oxígeno puede destruir PUFA rápidamente.

Como se menciona anteriormente, están descritas composiciones que comprenden lípidos que contienen DGLA y/o precursores de prostaglandina E1.

Tales composiciones se pueden preparar para usar en una diversidad de aplicaciones incluyendo, pero no limitadas a, alimentos animales, formulaciones para infantes humanos, suplementos alimentarios y composiciones de comida sana. Además de los lípidos que contienen DGLA mencionados anteriormente y/o los precursores de prostaglandina E1, dichas composiciones pueden comprender adicionalmente componentes activos incluyendo agentes

farmacéuticamente activos y nutracéuticamente activos, así como cargas, vehículos, tampones, agentes voluminizadores y otros excipientes e ingredientes inactivos como se conocen bien en la técnica. Detalles adicionales de excipientes que se pueden usar en composiciones farmacéuticas y nutracéuticas se pueden encontrar en trabajos de referencia estándar tales como Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co, Easton, Pa, EE.UU. (1980).

El siguiente ejemplo se proporciona para propósitos ilustrativos y con el fin de explicar y describir más en particular la presente invención.

Ejemplo

Mutagénesis

La cepa de *P. incisa* se aisló de una muestra de nieve del monte Oyama (Japón). La microalga se ha identificado como la clorofícea, *Parietochloris incisa* (Trebouxiophyceae) (Watanabe y cols. 1996, *Phycol. Res.* 44: 107-8).

Antes de mutagénesis, los cultivos se cultivaron en medio de nutrientes BG-11 (Stanier y cols., 1971, *Bacteriological Reviews*, 35: 171-205) en matraces de 150 ml en condiciones de temperatura y luz controladas. Los matraces se situaron en un agitador de temperatura regulada a 25 °C y se iluminaron por luces fluorescentes a una intensidad lumínica de 115 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ como se describe anteriormente (Bigogno y cols. 2002, *Phytochemistry* 60, 497-503). Los cultivos se proporcionaron con una mezcla de aire y CO₂ (99:1, v/v).

Se retiraron cincuenta ml de cultivos en crecimiento logarítmico y se sonicaron en matraces de 150 ml segregando las aglutinaciones celulares. Se expusieron diez ml de suspensión celular, que contienen mayoritariamente células individuales, al mutágeno, 1-metil-3-nitro-nitrosoguanidina (MNNG) a una concentración final de 100 $\mu\text{g/ml}$. La solución de reserva de MNNG se preparó en DMSO (5 mg/ml) facilitando la penetración del mutágeno a través de la pared celular del alga. Tras 1 h de incubación en un agitador incubador, las células se recogieron por centrifugación (1500 x g) y se lavaron con medio BG-11 libre de mutágeno. La etapa de lavado se repitió varias veces. Finalmente, las células se sonicaron en 10 ml de medio y se contaron los números de células de cultivos no tratados y tratados. Las suspensiones celulares se diluyeron secuencialmente hasta 1000 células/ml y se plaquearon 50-100 células en placas de Petri con medio de agar BG-11. Los cultivos resultantes se duplicaron y se incubaron en luz fluorescente a temperatura ambiente y a temperatura baja (15 °C). El porcentaje de células supervivientes se determinó después de 10 días. Se seleccionaron colonias, que mostraron crecimiento pobre o apariencia diferente a temperatura baja, para cultivo en medio BG11 líquido en matraces. Después de que se logró suficiente biomasa, las células se transfirieron en medio libre de nitrógeno líquido durante 14 días, se recogieron y se analizaron para composición de ácidos grasos.

La composición de ácidos grasos del tipo silvestre (WT) y del mutante deficiente en $\Delta 5$ desaturasa (MUT) de *P. incisa*, expresada como porcentaje de p/p de los ácidos grasos totales se muestra en la siguiente tabla.

Cepa	Composición de ácidos grasos (% de AG total)										DGLA/ AA	TFA (IDW)
	16:0	16:2 $\omega 6$	18:0	18:1 $\omega 9$	18:1 $\omega 7$	18:2	18:3 $\omega 3$	18:3 $\omega 6$	20:3 $\omega 6$	20:4 $\omega 6$		
WT	10,9	0,6	2,8	11,0	4,3	11,1	0,9	0,9	1,2	54,6	0,02	33,3
MUT	8,0	0,2	1,9	34,4	2,9	12,8	1,2	1,1	34,4	0,1	340	36,4

REIVINDICACIONES

1. Una cepa mutante de *Parietochloris incisa*, caracterizada porque comprende una concentración intracelular sustancialmente reducida de ácido araquidónico (AA) conjuntamente con una concentración intracelular sustancialmente incrementada de ácido dihomo-gamma-linolénico 20:3 ω 6 (DGLA), en el que dicha cepa es la cepa IKG-1, que tiene N.º de Acceso ATCC PTA- 8497.
- 5 2. Un procedimiento para producir DGLA, que comprende incubar una cepa mutante de la microalga *Parietochloris incisa* que es defectiva en su gen de la Δ 5 desaturasa (Δ 5D) y recuperar los lípidos que contienen DGLA de la misma, en el que dicha cepa es la cepa IKG-1, que tiene N.º de Acceso ATCC PTA-8497.
- 10 3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la proporción de DGLA a AA en los lípidos que contienen DGLA es mayor de 25:1 en peso.