

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 576 752**

51 Int. Cl.:

C12N 1/12 (2006.01)

A61K 8/99 (2006.01)

A61K 8/58 (2006.01)

A61K 36/02 (2006.01)

A23L 33/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2009 E 09737040 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2016 EP 2326708**

54 Título: **Microorganismos fotosintéticos enriquecidos con selenio a partir de compuestos seleno-hidroxiácidos y sus aplicaciones en nutrición, cosmética y farmacia**

30 Prioridad:

29.08.2008 FR 0855827

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

11.07.2016

73 Titular/es:

**METABOLIUM (100.0%)
Parc Biocitech, 102, avenue Gaston Roussel
93230 Romainville, FR**

72 Inventor/es:

**KUDLA, BERNARD;
DE BAENE, FRÉDÉRIC y
LANGE, MARC**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 576 752 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

Microorganismos fotosintéticos enriquecidos con selenio a partir de compuestos seleno-hidroxiácidos y sus aplicaciones en nutrición, cosmética y farmacia

5 La invención se refiere al enriquecimiento de microorganismos fotosintéticos con selenio orgánico, que incluye el uso de compuestos tal como seleno-hidroxiácidos, en particular con ácido 2-hidroxi-4-metilselenobutanoico, en forma (D,L), o un enantiómero, sal, derivado éster o amida de este compuesto, y al uso de microorganismos fotosintéticos enriquecidos de esta forma en la nutrición humana o animal, cosmética o farmacéutica.

10 El selenio es un micronutriente esencial particularmente para seres humanos y mamíferos, (Wendel, A.; Phosphorus, Sulfur Silicon Relat Elem., 1992, 67, 1-4, 405-415). En particular, participa en forma de L(+)-selenocisteína o L(+)-selenometionina (Muller, S. et al., Arch. Microbiol., 1997, 168, 421) para la biosíntesis de selenoproteínas tal como la glutatión peroxidasa, tioredoxina reductasa y selenoproteína P.

15 En seres humanos, se han notificado deficiencias de selenio, en particular en el caso de los pacientes sometidos a nutrición parenteral durante largos periodos (Von Stockhausen, H.B., Biol. Trace Elem. Res., 1988, 15: 147-155). El suplemento diario con 200 µg de selenio se considera seguro y adecuado para un ser humano adulto de peso medio (Schrauzer, G.N., J. Am. Col. Nutr., 2001, 20: 1-14).

20 El selenio se encuentra en la naturaleza en dos formas: orgánica e inorgánica.

Los compuestos inorgánicos frecuentemente son sales tal como selenito o selenato de sodio. Estos compuestos son altamente tóxicos para el ser humano y para la mayoría de los animales.

25 Los compuestos orgánicos (compuestos de organoselenio) están representados en los organismos vivos especialmente por los aminoácidos L(+)-selenometionina, L(+)-metilselenocisteína y L(+)-selenocisteína.

30 La L(+)-selenometionina es la principal fuente de selenio orgánico en seres humanos y animales. Sin embargo, el ser humano y los y animales son auxótrofos para este aminoácido, que solamente puede obtenerse a través de los alimentos.

35 Por lo tanto, sería ideal incorporar el selenio en su forma orgánica en los complementos alimenticios para tratar o prevenir la deficiencia de selenio.

Se ha podido demostrar, por tanto, que un suplemento alimenticio con L(+)-selenometionina es mucho menos tóxico y mostró mejor biodisponibilidad que una dosis en forma de selenito de sodio (Mony, M.C. et al., J. of Trace Elem. Exp. Med., 2000, 13: 367-380).

40 En la actualidad, no se conoce ninguna otra vía metabólica para la absorción de selenio por los organismos vivos distinta al uso de sustratos tal como el selenio inorgánico, principalmente en forma de selenito de sodio y selenometionina.

45 Se puede encontrar un aporte adecuado de selenio orgánico en las plantas superiores (en particular, trigo, maíz, soya), en los cuales más del 80 % del selenio se compone de L(+)-selenometionina (Schrauzer, G. N., J. Am. Coll. Nutr., 2001, 20 (1): 1-4). Sin embargo, la concentración de selenio en estas plantas no es suficiente para conseguir fácilmente, y a coste bajo, aditivos alimenticios.

50 Una de las formas estudiadas para obtener composiciones ricas en selenometionina es enriquecer ciertos microorganismos con selenio orgánico a partir del selenio inorgánico. Estos microorganismos, una vez enriquecidos, pueden ser la materia prima para la preparación de productos alimenticios o cosméticos.

Numerosas publicaciones describen, por ejemplo, la preparación de levadura enriquecida con selenio, en particular, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Oh Tae-Kwang et al., patente n.º KR950006950 del 26.06.1995) para su uso como tal o incorporada a composiciones alimenticias (Moesgaard S. et al., patente n.º DK200200408 de 16/09/2003); o para obtener productos derivados enriquecidos con selenio tal como, por ejemplo, pan (Wang Boaquan, patente n.º CN 1.817.143 de 08/16/2006), leche (Jeng-Yi Chang, patente n.º TW565432 de 12/11/2003), huevos (Li Cui et al., patente n.º CN1302723C de 07.03.2007), chocolate (In Gyeong Suk et al., patente n.º KR20040101145 de 08.11.2004) o cerveza (Yakovlev L.G. et al., patente n.º RU2209237 de 27/07/2003) enriquecidos con selenio. En el campo de los alimentos saludables, las preparaciones que contienen levadura enriquecida con selenio también se han sugerido para las mujeres embarazadas (Wang Weiyi, patente n.º CN1778199 de 05.31.2006), o para mejorar el microambiente intestinal de los pacientes con hipoglucemia (Li Tao Zhao, patente n.º CN1810161 de 08.02.2006). En el campo de la dermocosmética, las composiciones que contienen levadura enriquecida con selenio se han desarrollado para reducir la pérdida de pelo (Kasik Heinz, patente n.º DE19858670 de 21/06/2000) o para la prevención del fotoenvejecimiento (Norihsa Kawai et al., patente n.º JP07300409 de 14.11.1995). Las preparaciones farmacéuticas que contienen levadura enriquecida con selenio se

utilizan en la prevención y tratamiento de las enfermedades inflamatorias tal como retinopatía diabética (Ely Crary J., patente n.º US5639482 de 06.17.1997) o cardiovasculares (Nagy P.L. et al.; patente n.º HUT060436 de 09.28.1992).

Las bacterias, especialmente las bacterias probióticas también se han enriquecido con selenio (Calomme M. et al., Biol. Trace Elem. Res., 1995, 47, 379-383). El *Lactobacillus acidophilus* así como *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus ferintoshensis*, *Lactobacillus buchneri*/*parabuchneri* (Andreoni V. et al., patente n.º US0258964) se han descrito como complementos alimenticios enriquecidos con selenio. Se han preparado mezclas de probióticos que consisten de levaduras y lactobacilos para fortalecer el sistema inmunológico y la resistencia a las enfermedades (Huang Kehe Qin, patente n.º CN1283171C de 08.11.2006).

Sin embargo, en todas estas preparaciones, los microorganismos enriquecidos con selenio se prepararon solamente a partir de selenio inorgánico. Por lo tanto, la fuente de selenio más utilizada consiste en selenito o selenato de sodio disueltos en medios de cultivo de microorganismos. Los microorganismos enriquecidos de esta forma, aunque sintetizan cantidades satisfactorias de selenio orgánico asimilable por el cuerpo humano, frecuentemente tienen un índice alto de selenio inorgánico sin procesar, lo cual puede ser peligroso para el consumidor.

En una solicitud publicada anterior con n.º WO 2006/008190, se han descrito nuevos compuestos orgánicos de tipo seleno-hidroxiácidos como útiles para servir como precursores para la síntesis de L(+)-selenometionina en el ser humano y los animales.

Sorprendentemente, el solicitante ha observado que los compuestos orgánicos de tipo seleno-hidroxiácidos, tales como los descritos en la solicitud WO 2006/008190, se pueden incorporar a los medios de cultivo para enriquecer diferentes microorganismos fotosintéticos con selenio orgánico. Los resultados obtenidos mostraron que estos compuestos pueden enriquecer de manera muy eficaz tales microorganismos, especialmente en L(+)-selenometionina, con un rendimiento equivalente o superior al obtenido con los compuestos inorgánicos utilizados comúnmente.

Por lo tanto, es evidente que el enriquecimiento de microorganismos fotosintéticos con selenio orgánico a partir de compuestos orgánicos del tipo seleno-hidroxiácidos podría producir selenio orgánico exento de selenio inorgánico y, por lo tanto, resolver los problemas de toxicidad asociados con los métodos de la técnica anterior.

Los microorganismos fotosintéticos y enriquecidos se pueden utilizar directamente en la alimentación en el contexto de la prevención o tratamiento de la deficiencia de selenio, principalmente para el propósito de producir productos y composiciones farmacéuticas, nutricionales o cosméticas.

Descripción detallada de la invención

La presente solicitud se refiere a obtención de los microorganismos fotosintéticos; es decir, organismos cuyo crecimiento depende de una fuente de energía luminosa.

Por microorganismo se entiende cualquier organismo vivo unicelular que pertenezca a uno de los siguientes reinos especies: monera, protista, hongos y protozoarios, con una estructura de células eucariotas o procariotas microscópica o ultramicroscópica, con un potencial metabólico y de reproducción. Tales organismos unicelulares pueden estar implicados en la formación de filamentos o biopelículas.

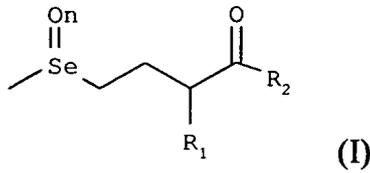
Preferentemente, los organismos fotosintéticos de acuerdo con la invención son microalgas eucariotas, o microalgas procariotas tales como las cianobacterias, preferentemente microalgas del género *Chlorella* o de los géneros *Spirulina* o *Arthrospira* (espirulina). Estas últimas son bien conocidas del experto en la materia para su uso como complementos alimenticios, particularmente en los países en desarrollo.

Por selenio orgánico se entiende un conjunto de moléculas que contienen al menos un compuesto que tiene por lo menos un átomo de selenio en su estructura química que se puede producir por un organismo vivo, tal como, particularmente los aminoácidos selenometionina, metilselenocisteína y selenocisteína, o los péptidos o proteínas que los contienen.

Los microorganismos fotosintéticos enriquecidos de esta forma con selenio se pueden utilizar como tal, o como aditivo alimenticio. Por ejemplo, se pueden deshidratar para formar un polvo estable que se puede incorporar a composiciones como base para la elaboración de productos procesados, pero también se pueden utilizar vivos como probióticos en el proceso de elaboración de alimentos para obtener, por ejemplo, leches y bebidas fermentadas.

La presente invención tiene por tanto por objetivo proporcionar un nuevo proceso para enriquecer microorganismos fotosintéticos con selenometionina y/o selenocisteína, caracterizado por que dicho organismo fotosintético se cultiva en un medio de cultivo que comprende un compuesto del tipo seleno-hidroxiácido de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1, o bien una sal, un derivado éster o una amida del mismo:

Un compuesto del tipo seleno-hidroxiácido es un compuesto de la fórmula general (I), un precursor, sal o un derivado éster o amida del mismo:



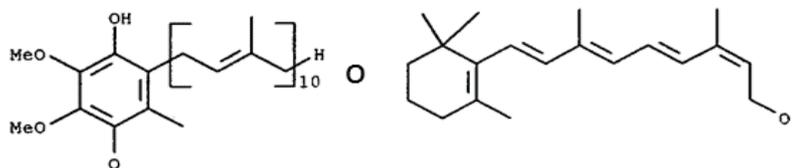
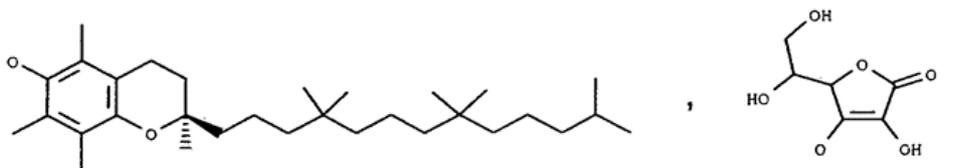
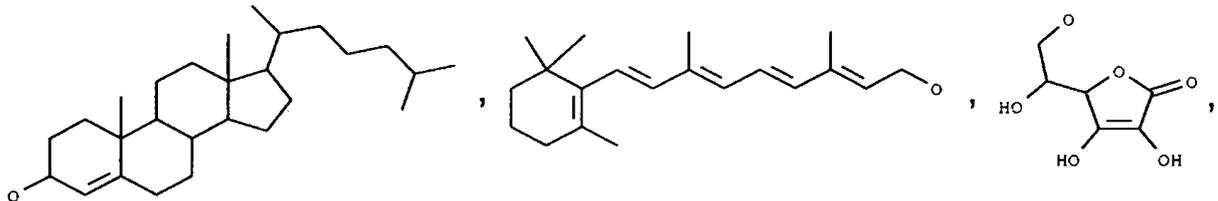
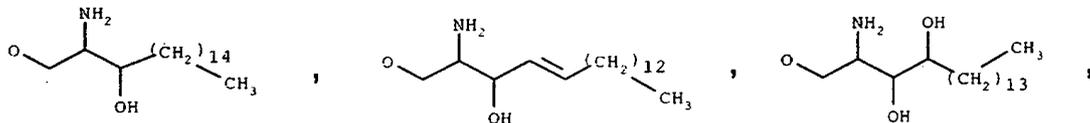
5 en la que:

n es 0, 1 o 2;

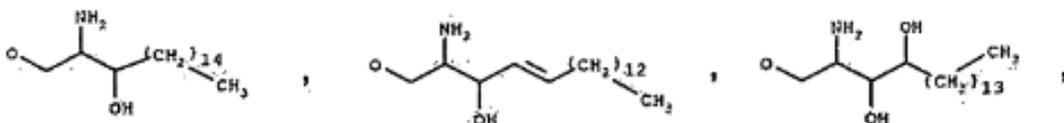
R₁ es un grupo OH, OCOR₃, OPO₃H₂, OPO₃R₄R₅ u OR₆;

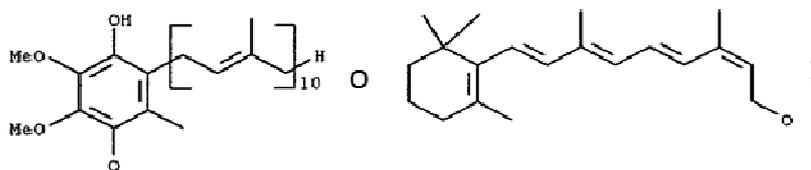
10 **R₂** es un grupo OH, R₃, NHR₇, S-cisteinilo o S-glutacionilo con la condición que cuando n = 1 y R₂ es OH, entonces R₁ no puede ser OH;

R₃ es un grupo alcoxilo, ceramida 1, ceramida 2, ceramida 3, ceramida 4, ceramida 5, ceramida 6a y 6b, S-cisteinilo, S-glutacionilo, o un grupo seleccionado de las siguientes opciones:



20 Preferentemente, **R₃** es un grupo alcoxilo, S-cisteinilo, S-glutacionilo;
OR₄ es un grupo alcoxilo (C₁-C₂₆), ceramida 1, ceramida 2, ceramida 3, ceramida 4, ceramida 5, ceramida 6a y 6b, o un grupo seleccionado de las siguientes opciones:





Preferentemente **OR₅** es un grupo alcoxilo (C₁-C₂₆).

- 5 **OR₆** es un grupo piruvato, lactato, citrato, fumarato, maleato, miristato, palmitato, estearato, palmitoleato, oleato, linoleato, ácidos grasos naturales o 13-cis retinoato;
R₇ es un grupo H, alquilo(C₁-C₂₆), un aminoácido natural o amina natural.

En la fórmula (I) anterior:

- 10
- por alquilo, se entiende un grupo de 1 a 26 átomos de carbono lineal o cíclico, opcionalmente ramificado, opcionalmente fluorado o polifluorado y, opcionalmente con uno o más enlaces dobles de carbono-carbono tal como, por ejemplo, metilo, etilo, isopropilo, trifluorometilo, linoleilo, linolenilo, palmitoilo.
 - por alcoxilo, se entiende un grupo derivado de un alcohol primario, secundario o terciario de 1 a 26 átomos de carbono, lineal o cíclico, opcionalmente ramificado, opcionalmente fluorado o polifluorado y, opcionalmente, comprende uno o más enlaces dobles carbono-carbono, tales como, por ejemplo, metoxilo, etoxilo, isopropoxilo, trifluorometoxilo, linoleoxilo, linolenoxilo, palmitoxilo.
- 15
- las estructuras de los radicales de tipo ceramida se describen principalmente en "Cosmetic Lipids and the Skin Barrier", Thomas Förster Ed. 2002, Marcel Dekker, Inc., página 2, figura 2.
- 20
- por natural, se entiende cualquier compuesto correspondiente que se encuentra en el metabolismo de los organismos vegetales, animales y en el ser humano (Steglich W., Römpp Encyclopedia Natural Products, G. Thieme ed.).
 - por oligómero, se entiende cualquier compuesto formado por el enlace de 2 a 15 monómeros unidos entre sí a través de un enlace de tipo éster.
- 25
- por polímero, se entiende cualquier compuesto formado por el enlace de más 15 de monómeros unidos entre sí a través de un enlace de tipo éster.

El compuesto de selenohidroxiácido de fórmula (I) de acuerdo con la invención es el de la reivindicación 1, para el que n = 0, y cada uno de R₁ y R₂ es un hidroxilo, o bien una sal un derivado éster o amida de dicho compuesto.

30 De acuerdo con la invención, dicho compuesto de fórmula (I) se utiliza preferentemente en forma de sales de calcio, zinc o magnesio, que por lo general permiten una mejor solubilidad en medios de cultivo, y una mejor asimilación por los microorganismos fotosintéticos.

35 En una realización preferida de la invención, el microorganismo fotosintético se selecciona del grupo que consiste de cianofíceas y clorofíceas. Así, el microorganismo fotosintético se selecciona ventajosamente entre las clorofíceas o clorofíceas, preferentemente se selecciona del grupo que consiste de clorofíceas del genero *Chlorella* y cianofíceas del género *Spirulina* o *Arthrospira*.

40 La invención se refiere más concretamente a la utilización de un compuesto de fórmula (I) elegido (o seleccionado) de:

- 45
- ácido L-2-hidroxi-4-metilselenobutanoico,
 - ácido D-2-hidroxi-4-metilselenobutanoico,
 - ácido DL-2-hidroxi-4-metilselenobutanoico,
 - o una sal de estos compuestos.

Estos compuestos se describen en la solicitud WO 2006/008190.

50 La invención también se refiere a un microorganismo fotosintético enriquecido con selenio orgánico, que se puede obtener por el método de la invención de acuerdo con la reivindicación 7. Este microorganismo tiene generalmente un contenido de selenio orgánico superior a 1000 ppm, más preferentemente superior a 2000 ppm de selenio equivalente y preferentemente menos de un 1,5 %, preferentemente menos de 0,5 %, preferentemente menos del 0,1 % en peso de selenio inorgánico con respecto al selenio total.

55 En otras palabras, los restos de selenio en forma inorgánica presentes en los microorganismos fotosintéticos enriquecidos de acuerdo con el procedimiento método de la invención representan generalmente menos del 1,5 % del total de selenio presente en los microorganismos, que por lo general representa menos del 0,5 % de la biomasa seca total (peso en seco) del microorganismo.

La invención se refiere especialmente a un microorganismo fotosintético enriquecido con selenio orgánico de acuerdo con una de las reivindicaciones 7 a 17. Preferentemente, se caracteriza por que el contenido de selenio de dicho microorganismo en forma de selenometionina representa más del 70 %, preferentemente más del 80 % e incluso más preferentemente más del 90 % en peso de selenio, con respecto al selenio total presente en dicho microorganismo fotosintético. Tal proporción de selenometionina representa una mejora, en términos de cantidad y calidad del selenio orgánico presente en este microorganismo, de forma sustancial y particularmente ventajosa en comparación con lo obtenido en la técnica anterior.

En particular, la invención se refiere al caso en que el microorganismo se caracteriza por ser una microalga cloroficea enriquecida en selenio, y en que el microorganismo tiene un contenido de selenometionina generalmente mayor de 1000 µgSe/g en peso en seco de dicho microorganismo.

La cantidad de selenio fijada en el interior de los microorganismos se expresa en forma de moléculas orgánicas (selenometionina, selenocisteína u otros) o inorgánicas (sales de selenio) en peso de selenio por gramo (µgSe/g) de peso en seco de los microorganismos. En otras palabras, el contenido de selenio de los microorganismos fotosintéticos se determina mediante el cálculo del peso de selenio presente en estas moléculas, orgánicas o inorgánicas, con respecto a la biomasa seca total del microorganismo. Por otra parte, las fracciones en peso de selenio presentes en las formas orgánicas e inorgánicas se establecen y expresan en porcentaje con respecto al peso total de selenio.

El contenido de selenio total y en forma de selenometionina en los microorganismos fotosintéticos de acuerdo con la invención se puede determinar, respectivamente, por la mineralización y digestión enzimática después de la centrifugación y liofilización de los microorganismos, por ejemplo, mediante el método de acuerdo con Lobinsky et al., descrito en Mester, Z. et al., (2006) *Annal. Bioanal. Chem.* 385: 168-180.

Los resultados obtenidos de acuerdo con la presente invención, ilustrados en los ejemplos de esta solicitud, muestran que los microorganismos fotosintéticos, particularmente las microalgas cloroficeas y cianofíceas acumulan selenio en forma de selenometionina en un contenido generalmente mayor de 1000 µgSe/g de peso en seco, e incluso superior a 1400 µgSe/g de peso en seco de estas microalgas.

La invención se refiere más particularmente a una cloroficea o cianoficea enriquecida con selenio orgánico, caracterizada por que el contenido de selenio orgánico en forma de selenometionina es generalmente superior a 1000 µgSe/g de peso en seco.

Tal cloroficea o cianoficea enriquecida con selenio orgánico se caracteriza generalmente por que su contenido de selenio orgánico en forma de selenometionina representa más del 70 %, más preferentemente más del 80 %, muy preferentemente más de 90 %, incluso más del 95 % del selenio total contenido en la misma y, también, se caracteriza por que su contenido residual de selenio inorgánico es generalmente inferior al 0,5 %, más preferentemente inferior al 0,1 % del total de selenio contenido en la misma. En general, el contenido residual de selenio inorgánico es inferior al 1 %, preferentemente inferior al 0,5 %, más preferentemente inferior al 0,2 %, y muy preferentemente inferior al 0,1 % de la biomasa total de la cloroficea en peso en seco.

La invención también se refiere a la fabricación de productos alimenticios, cosméticos o farmacéuticos a partir de dichos microorganismos fotosintéticos enriquecidos con selenio mediante el método de la presente invención. La fabricación se realiza a través de las técnicas conocidas por los expertos en la técnica.

Los microorganismos fotosintéticos de acuerdo con la invención también pueden ser útiles en la nutrición animal, especialmente para la obtención de derivados secundarios enriquecidos con selenio orgánico, tal como de pescado, leche o huevos.

Las moléculas y sus derivados así obtenidos son útiles en diferentes aplicaciones, incluyendo las mencionadas en el preámbulo, incluso como un agente cosmético, farmacéutico o nutricional.

La invención tiene también por objetivo el uso de un microorganismo fotosintético enriquecido con selenio de acuerdo con la invención de las reivindicaciones 7 a 17 como un producto (o agente), cosmético, farmacéutico (o terapéutico), o nutricional.

La invención también se refiere a composiciones, en general, cosméticas, farmacéuticas o nutricionales, que comprenden los microorganismos fotosintéticos.

La invención también se refiere a un medio de cultivo para microorganismos fotosintéticos, caracterizado por que comprende el compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la invención anteriormente definido y de acuerdo con la reivindicación 1. Un medio de cultivo de ese tipo es útil para la aplicación del proceso de enriquecimiento de microorganismos fotosintéticos con selenio de acuerdo con la invención.

En particular, la invención se refiere a un medio de cultivo sólido o líquido que comprende por lo menos un

compuesto de fórmula (I), preferentemente el ácido 2-hidroxi-4-metilselenobutanoico o una sal del mismo a una concentración de entre 0,5 y 2000 mg/l, preferentemente entre 1 y 1000 mg/l, más preferentemente entre 2 y 500 mg/l, respectivamente, de 0,2 a 800 mg/l del compuesto en equivalente de selenio, preferentemente entre 0,4 y 400 mg/l del compuesto en equivalente de selenio, más preferentemente entre 0,8 y 200 mg/l del compuesto en equivalente de selenio.

Para las microalgas de origen marino, los compuestos de fórmula (I) se pueden diluir con agua de mar esterilizada por filtración o agua de mar sintética, por ejemplo, a partir de un medio "Reef Crystal" de la Société Aquarium Systems Inc., para formar un medio de cultivo mínimo.

Un método para la preparación de microalgas de la invención puede comprender, en particular, una o más de las siguientes etapas:

- preparar un medio de cultivo, preferentemente un medio mínimo que contiene los elementos químicos necesarios para el crecimiento de las microalgas;
- introducir en el medio de cultivo un compuesto de fórmula (I), preferentemente de ácido 2-hidroxi-4-metilselenobutanoico como fuente orgánica de selenio;
- ajustar el pH de la mezcla a un valor entre 6 y 10;
- cultivar un inóculo de un precultivo de microalgas en la mezcla así formada a una temperatura entre 12 y 45°C con agitación orbital entre 100 y 500 rpm, y a una atmósfera que puede contener de 0 a 20 % de oxígeno y 0,3 a 20 % de gas carbónico, preferentemente durante de 24 a 120 horas;
- centrifugar la mezcla entre 4000 y 10000 rpm durante algunos minutos, o filtrar la mezcla con un filtro de 0,2 micrómetros y enjuagar con solución salina el filtro;
- introducir el aglomerado celular en solución salina fisiológica;
- centrifugar nuevamente a entre 4000 y 10000 rpm durante algunos minutos;
- recuperar el aglomerado celular húmedo que son las microalgas enriquecidas con selenio;

El aglomerado celular húmedo se puede secar al aire.

Otras características y ventajas de la invención se proporcionan en los siguientes ejemplos. Los siguientes ejemplos se proporcionan solamente con fines ilustrativos y no limitan en forma alguna el alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: producción de la microalga *Chlorella vulgaris* SAG211-11 B enriquecida con selenio en un medio que contiene ácido 2-hidroxi-4-metilselenobutanoico (THD-177) en condiciones autótrofas

Condiciones experimentales

La cepa utilizada en condiciones fotoautótrofas es *Chlorella vulgaris* SAG211 B-11: una cepa axénica originaria de la colección SAG de la Universidad de Göttingen (SAG: Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen).

Esta cepa se cultivó en medio BG-11 (Blue-Green medium) descrito por [Stanier RY et al., 1971 Bacteriol. Rev. 35: 171-205], cuya composición es la siguiente (para 1 l)

- (1) NaNO₃: 1,5 g
- (2) K₂HPO₄: 0,04 g
- (3) MgSO₄·7H₂O: 0,075 g
- (4) CaCl₂·2H₂O: 0,036 g
- (5) Ácido cítrico: 0,006 g
- (6) Citrato amonio férrico: 0,006 g
- (7) EDTA-Na₂: 0,001 g
- (8) Na₂CO₃: 0,02 g
- (9) Agua destilada: 1,0 l
- (10) Solución de oligoelementos: 1 ml/l

- H₃BO₃: 2,86 g
- MnCl₂·4H₂O: 1,81 g
- ZnSO₄·7H₂O: 0,222 g
- Na₂MoO₄·2H₂O: 0,39 g
- CuSO₄·5H₂O: 0,08 g
- Co(NO₃)₂·6H₂O: 0,05 g

El pH se ajustó a 7,1 y el medio se sometió a autoclavado a 121 °C durante 15 minutos.

Esta cepa se cultivó a 25°C, 2400 +/-200 Lux en condiciones fotoautótrofas durante de 2 a 7 días con agitación

orbital (80 rpm), $DO_{intit660nm} = 0,05$. La DO_{660nm} de la cepa alcanzó 0,5 en 48 horas.

Condiciones de cultivo

5 La fuente orgánica de selenio, es decir, el ácido 2-hidroxi-4-metilselenobutanoico (THD-177, Tetrahedron SAS, Francia, CAS: 873660-49-2) se administró a una concentración entre 0,5 mg/l y 100 mg/l de equivalente de selenio; es decir, respectivamente 1,25 mg/l y 250 mg/l del ácido 2-hidroxi-4-metilselenobutanoico. La adición del compuesto de selenio se realizó de una vez (es decir, 100 ml de cultivo para una cantidad entre 0,125 mg y 25 mg) al inicio del cultivo o varias veces a intervalos regulares de tiempo, a intervalos cuya duración fue de entre 6 y 24 horas, manteniéndose el cultivo durante un período de 2 a 7 días.

10 Ejemplo 2: producción de la microalga *Chlorella vulgaris* en un medio enriquecido con selenio que contiene ácido 2-hidroxi-4-metilselenobutanoico (THD-177) (ejemplo de la invención) o en un medio que contiene selenito de sodio (ejemplo comparativo) en condiciones mixotróficas (presencia de luz y carbohidrato -glucosa- en el medio):

15 En estas pruebas, la cepa utilizada es una cepa de *Chlorella vulgaris* SAG211-11B: una cepa axénica procedente de la colección SAG de la Universidad de Göttingen (SAG: Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen) fue cultivada en condiciones mixotróficas en el siguiente medio:

20	Extractos de levadura:	0,33 g
	Extractos de carne:	0,33 g
	Triptosa:	0,66 g
	FeSO ₄ :	0,66 mg
	Glucosa:	3,3 g
	Agua destilada:	1,0 c.s.

25 El pH se ajustó a 7,2 y el medio se autoclavó a 121 °C durante 15 minutos.

30 La fuente orgánica de selenio, es decir, el ácido 2-hidroxi-4-metilselenobutanoico (THD-177, Tetrahedron SAS, Francia CAS :873660-49-2) se administró a una concentración de 20 mg/l de equivalentes de selenio, o 50 mg/l de ácido 2-hidroxi-4-metilselenobutanoico.

La fuente de selenio inorgánico (SeNa, selenito de sodio) se administró a una concentración de 20 mg/l de equivalente de selenio, o 43,9 mg/l de selenito de sodio.

35 La adición de los compuestos de selenio se llevó a cabo sólo una vez en la fase de crecimiento exponencial de la cepa *Chlorella vulgaris* (es decir, tres días después de la inoculación).

Preparación de muestras para análisis

40 Después de 7 días de incubación, el medio se filtró a través de una membrana Nalgene de 0,2 micrómetros (Ref. a-PSE, 90 mm de diámetro) y el aglomerado celular se lavó con solución salina fisiológica. El aglomerado celular húmedo se liofilizó para el análisis de los componentes de selenio (selenio total, selenometionina y selenito de sodio).

45 Análisis de los componentes de selenio de *Chlorella vulgaris*

50 El selenio total se determinó por ICP acoplado con detección de masas, después de la mineralización de la muestra. La especiación de selenio se realizó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento, junto con la detección de masas después de la digestión enzimática de la muestra, de acuerdo con el método descrito por Lobinsky et al., en Mester, Z. et al., (2006) *Annal. Bioanal. Chem.* 385: 168-180.

Resultados

55 La siguiente tabla 1 muestra los valores promedio obtenidos en equivalentes de selenio por triplicado durante periodos de incubación de 7 días.

Tabla 1

Análisis de los componentes de selenio de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i>			
	Se total en mgSe/kg de biomasa	SeMetionina en mgSe/kg de biomasa	Se(IV) en mgSe/kg de biomasa
Adición de THD177 a 20 mgSe/l	1293±23	1274±109 (98,5 % de Se total)	6±1 (0,4 % de Se total)
Adición de SeNa a 20 mgSe/l	144±5	29±2 (20 % de Se total)	4,1±0,4 (2,7 % de Se total)

Los resultados obtenidos mostraron, para la misma dosis de aditivo de selenio en forma de THD177 o SeNa a 20 mgSe/l, que:

- 5 - se detecta nueve veces de Se total si la adición se realiza con THD177 que si la adición se hace con SeNa;
- el nivel de selenio acumulado intracelular en forma de selenometionina obtenido por la adición de THD177 es 44 veces mayor que el obtenido por la adición de SeNa;
- 10 - el índice de selenio acumulado intracelular en forma de selenometionina alcanzó casi el 100 % (98,5 %) de formas de selenio intracelular si la adición se realiza con THD177 en comparación con un índice de 20 % con Sena, y;
- 15 - solamente se detectó el 0,4 % de Se(IV) en el selenio total si la adición se realiza con THD177, mientras que el 2,7 % de Se(IV) se detectó en el selenio total en caso de añadir SeNa.

Ejemplo 3: Producción de la microalga *Arthrospira platensis* enriquecida con selenio en un medio que contiene ácido 2-hidroxi-4-metilselenobutanoico (THD-177) (ejemplo de la invención) o en medio que contiene selenito de sodio (ejemplo comparativo) en autótrofos

20 En estos ensayos, la cepa utilizada es una cepa de *Arthrospira platensis* 3054-E0001, depositada el 4 de agosto de 2009 en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM) en el Instituto Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 París Cedex 15, con el n.º 1-4218 CNCM.

25 La cepa 3054-E0001 se cultivó en condiciones autótrofas en el siguiente medio:

30	Extractos de levadura:	0,33 g
	Extractos de carne:	0,33 g
	Tryptosa:	0,66 g
	FeSO ₄ :	0,66 mg
	Agua destilada:	1 l c.s.

El pH se ajustó a 7,2 y el medio de sometió a autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

35 La fuente orgánica de selenio, es decir, el ácido de 2-hidroxi-4-metilselenobutanoico (THD-177, Tetrahedron SAS, Francia, CAS: 873660-49-2) se administró a una concentración de 25 mg/l de equivalente de selenio, o 62,5 mg/l de 2-hidroxi-4-metilselenobutanoico.

40 La fuente de selenio inorgánico (SeNa, selenito de sodio) se administró a una concentración de 25 mg/l de equivalente de selenio, 54,4 mg/l de selenito de sodio.

La adición de compuestos de selenio se realizó una vez poco después de la inoculación de la cepa de *Arthrospira platensis* (es decir, T = 0).

45 Preparación de muestras para análisis

Después de 10 días de incubación, el aglomerado celular se filtró a través de una membrana de Nalgene de 0,2 micrómetros, y el residuo celular se lavó con solución salina. La masa celular húmeda se liofilizó para el análisis de los componentes de selenio (selenio total, selenometionina y selenito de sodio).

50 Análisis de los componentes de selenio de *Arthrospira platensis*

El selenio total se determinó por ICP acoplado con detección de masas, después de la mineralización de la muestra. La especiación de selenio se realizó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento, junto con la detección de masas después de la digestión enzimática de la muestra, de acuerdo con el método descrito por Lobinsky et al., en Mester, Z. et al., (2006) *Annal. Bioanal. Chem.* 385: 168-180.

Resultados

60 La siguiente tabla 2 muestra los valores promedio obtenidos en equivalentes de selenio por triplicado durante un periodo de incubación de 10 días.

Tabla 2

Análisis de los componentes de selenio de la microalga <i>Arthrospira platensis</i>			
	Se total en mgSe/kg de biomasa	SeMetionina en mgSe/kg de biomasa	Se(IV) en mgSe/kg de biomasa

Adición de THD177 a 25 mgSe/l	1431±68	1402±47 (98 % de Se total)	17,2±0,7 (1,2 % de Se total)
Adición de SeNa a 25 mgSe/l	177±2	13±3 (7 % de Se total)	5,1±0,3 (2,9 % de Se total)

Los resultados para la misma dosis de selenio agregado como THD177 o SeNa a 25 mgSe/l, mostraron:

- 5 - ocho veces de Se total detectado para una adición de THD177 en comparación con una adición de SeNa;
- el nivel de selenio acumulado intracelular en forma de selenometionina obtenido tras la adición de THD177 es 108 veces mayor que el obtenido tras la adición de SeNa;
- el índice de selenio acumulado intracelular en forma de selenometionina alcanzó el 98 % de las formas de selenio intracelular si la adición se realiza con THD177 en comparación con un índice del 7 % para SeNa, y;
- 10 - solamente se detectó un 1,2 % de Se(IV) en el selenio total si la adición es con THD177, mientras que 2,9 % de Se(IV) se detectó en el selenio total en caso de agregar SeNa.

Ejemplo 4: La producción de la microalga *Arthrospira platensis* enriquecida con selenio en un medio que contiene ácido 2-hidroxi-4-metilselenobutanoico (THD-177) (ejemplo de la invención)

- 15 En estos ensayos, la cepa utilizada es una cepa de *Arthrospira platensis* 3054-E0001. Se compararon los resultados
- del ejemplo anterior, el ejemplo 3, en el que se llevó a cabo la adición del compuesto de seleniuro THD-177 de la invención, una vez poco después de la inoculación de la cepa *Arthrospira platensis*, con
- 20 - un nuevo experimento en el que la adición de acuerdo con la invención del compuesto de seleniuro THD-177 se realizó durante la fase experimental del cultivo de dicha cepa de *Arthrospira platensis*, como en el ejemplo 2.

Resultados

La siguiente tabla 3 muestra los valores promedio obtenidos en equivalentes de selenio por triplicado durante un periodo de incubación de 10 días.

Tabla 3

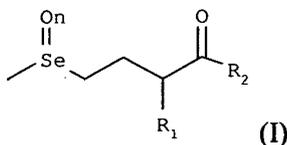
Análisis de los componentes de selenio de la microalga de <i>Arthrospira platensis</i>				
Análisis de los componentes de selenio de la microalga de <i>Arthrospira platensis</i>	Se total en mgSe/kg de biomasa	SeMetionina en mgSe/kg de biomasa	THD177 en mgSe/kg de biomasa	Se(IV) en mgSe/kg de biomasa
Adición a la inoculación de THD177 a 25 mgSe/l	1431±68	1402±47 (98 % de Se total)	5±1 (0,35 % de Se total)	17,2±0,7 (1,2 % de Se total)
Adición a la fase exponencial de THD177 a 25 mgSe/l	1274±16	1078±89 (85 % de Se total)	11±2 (0,86 % de Se total)	14±2 (1,1 % de Se total)

30 Los resultados mostraron que se obtuvo más del 12 % de selenio total y más del 30 % de selenometionina en la prueba de "adición a T0" con respecto al ensayo de "adición durante la fase exponencial". Esta diferencia podría ser el resultado del tiempo de contacto más largo de la biomasa con THD177 en el ensayo de "adición a T0" con respecto al otro ensayo de "adición durante la fase exponencial".

35 En ambos casos, el índice intracelular en Se(IV) permanece bajo a 1 % de selenio total.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de enriquecimiento de un microorganismo fotosintético con selenio orgánico, **caracterizado por que** el organismo fotosintético se cultiva en un medio que comprende un compuesto del tipo seleno-hidroxiácidos de la fórmula general (I) tal como se define a continuación, una sal, un derivado éster o una amida de dicho compuesto:



2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que dicho microorganismo está enriquecido en selenometionina.
3. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado por que** dicho compuesto de fórmula (I) se selecciona entre:
- ácido L-2-hidroxi-4-metilselenobutanoico,
 - ácido D-2-hidroxi-4-metilselenobutanoico,
 - ácido DL-2-hidroxi-4-metilselenobutanoico,
- o una sal de estos compuestos.
4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por que** dichos compuestos de fórmula (I) están en forma de sales de calcio, zinc o magnesio.
5. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado por que** el microorganismo fotosintético se selecciona del grupo constituido por cianofíceas, clorofíceas y *Chlorella*.
6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado por que** el microorganismo fotosintético se selecciona del grupo constituido por las cianofíceas de los géneros *Spirulina* o *Arthorspira*.
7. Microorganismo fotosintético enriquecido en selenio orgánico que se puede obtener de acuerdo con el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, estando **caracterizado** dicho microorganismo fotosintético **por que** su contenido de selenio orgánico, en forma de selenometionina, es superior a 1000 µgSe/g de peso en seco de dicho microorganismo fotosintético.
8. Microorganismo fotosintético enriquecido en selenio orgánico de acuerdo con la reivindicación 7, estando **caracterizado** dicho microorganismo fotosintético **por que** su contenido de selenio orgánico, en forma de selenometionina, representa más del 70 %, más preferentemente más del 80 % y aún más preferentemente más del 90 % en masa de selenio, con respecto al selenio total presente en dicho microorganismo fotosintético.
9. Microorganismo fotosintético enriquecido en selenio orgánico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 y 8, **caracterizado por que** dicho microorganismo fotosintético comprende menos del 1,5 %, preferentemente menos de 0,5 %, más preferentemente menos de 0,1 % en masa del selenio inorgánico con respecto al selenio total.
10. Clorofícea enriquecida en selenio orgánico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, **caracterizada por que** su contenido de selenio orgánico, en forma de selenometionina, es superior a 1000 µgSe/g de peso en seco de dicha clorofícea.
11. Clorofícea enriquecida enriquecido en selenio orgánico de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizada por que** su contenido de selenio orgánico, en forma de selenometionina, representa más del 70 %, más preferentemente más del 80 % y aún más preferentemente más del 90 % en masa de selenio, de la masa total de selenio que contiene.
12. Clorofícea enriquecida en selenio orgánico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 y 11, **caracterizada por que** su contenido residual de selenio inorgánico es inferior al 2 %, preferentemente inferior al 1,5 %, más preferentemente inferior al 1 % en masa, con relación al selenio total que contiene.
13. Microorganismo fotosintético enriquecido en selenio orgánico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, **caracterizado por que** pertenece al género *Chlorella*.
14. Cianofícea enriquecida en selenio orgánico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, **caracterizada por que** su contenido de selenio orgánico, en forma de selenometionina, es superior a 1000 µgSe/g

de peso en seco de dicha cianofícea.

- 5 15. Cianofícea enriquecida en selenio orgánico de acuerdo con la reivindicación 14, **caracterizada por que** su contenido de selenio orgánico, en forma de selenometionina, representa más del 70 %, más preferentemente más del 80 % y aún más preferentemente más del 90 % en masa de selenio, de la masa total de selenio que contiene.
- 10 16. Cianofícea enriquecida en selenio orgánico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 y 15, **caracterizada por que** su contenido residual de selenio inorgánico es inferior al 2 %, preferentemente inferior al 1,5 %, más preferentemente inferior al 1 % en masa, con relación al selenio total que contiene.
- 15 17. Cianofícea de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, **caracterizada por que** pertenece a los géneros *Spirulina* o *Arthorspira*.
18. Uso de un microorganismo fotosintético enriquecido en selenio orgánico de acuerdo con una de las reivindicaciones 7 a 17, como agente cosmético o nutricional.
- 20 19. Composición que comprende al menos un microorganismo fotosintético enriquecido en selenio orgánico de acuerdo con una de las reivindicaciones 7 a 17.
- 20 20. Composición de acuerdo con la reivindicación 19, **caracterizada por que** dicha composición es cosmética, farmacéutica o nutricional.
21. Medio de cultivo para microorganismos fotosintéticos, **caracterizado por que** comprende uno o varios compuestos de tipo seleno-hidroxiácido de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1.