

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 081**

21 Número de solicitud: 201531814

51 Int. Cl.:

**C12N 1/12** (2006.01)

**C12P 7/40** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**15.12.2015**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**15.06.2017**

71 Solicitantes:

**INTERQUIM, S.A. (50.0%)**

**C/ Joan Buscallà, 10**

**08173 SANT CUGAT DEL VALLÈS (Barcelona) ES**

**y**

**INSTITUT QUÍMIC DE SARRIÀ CENTRE**

**D'ENSENYAMENT SUPERIOR, FUNDACIÓ**

**PRIVADA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**PELLICER MOYA, María Teresa ;**

**ABAD I SANCHEZ, Sergi;**

**PLANAS SAUTER, Antoni y**

**TURON CASALPRIM, Xavier**

74 Agente/Representante:

**ZEA CHECA, Bernabé**

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN DE DHA**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a un cultivo para la producción de DHA que comprende al menos un alga productora de DHA de la clase de los Laberintulidos, y que comprende en proporciones específicas al menos una fuente de carbono, al menos un extracto de levadura y una o más fuentes secundarias de nitrógeno. La presente invención también se dirige a un proceso de fermentación que utiliza dicho cultivo y a los productos de fermentación obtenidos.

ES 2 617 081 A1

## PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN DE DHA

## DESCRIPCIÓN

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un cultivo y a un proceso para la producción de DHA mediante el cultivo de un alga de la clase de los *Laberintulidos* (conocido también como *Labirinthulomicetes*).

10 **Antecedentes de la invención**

El ácido Docosahexaenoico (DHA) es un ácido graso omega 3 abundante, entre otros, en peces y algas, y su consumo se ha relacionado con un menor riesgo de padecer Alzheimer o enfermedades coronarias. Se ha demostrado que el DHA es esencial para el mantenimiento del desarrollo normal de la retina así como de la función de esta. También hay pruebas de la importancia en el desarrollo neuronal. De hecho, las membranas de las neuronas humanas, contienen un 40 % de DHA. También se conoce como ácido cervónico y su nombre IUPAC es ácido (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenóico. El descubrimiento de su producción mediante fermentación constituye una alternativa interesante. Existe por tanto un interés por el diseño de medios de cultivo cada vez más eficientes y procesos de fermentación optimizados. Una de las clases más estudiadas ha sido la de los *Laberintulidos* (conocido también como *Labirinthulomicetes*). Aunque se han estudiado algunas variantes, el cultivo utilizado viene siendo el mismo desde hace ya muchos años, y sus componentes principales lo constituyen una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, NaCl, diversas vitaminas, vitaminas del grupo B y sales de diversos metales como el magnesio, el calcio y el potasio. La fuente de nitrógeno suele ser un extracto de levadura (YE), complementada por una fuente secundaria de nitrógeno (SN<sub>2</sub>), como la peptona o la triptona, en la que la YE y la SN<sub>2</sub> se añaden en cantidades similares. En Chi et al. (Z. Chi, Y. Liu, C. Frear, S. Chen, Study of a two-stage growth of DHA-producing marine algae *Schizochytrium limacinum* SR21 with shifting dissolved oxygen level., Appl. Microbiol. Biotechnol. 81, 1141–8 (2009)) se describe el cultivo de *A. limacinum* en fed-batch variando la concentración de oxígeno y utilizando un cultivo inicial que contiene proporciones glucosa:YE:peptona de 10:2:2 en agua marina artificial compuesta por, entre otros, 18 g/L de NaCl, 2,44 g/L de MgSO<sub>4</sub> ·7H<sub>2</sub>O, 0,6 g/L de KCl, 1,0 g/L de NaNO<sub>3</sub>, 0,3 g/L de CaCl<sub>2</sub> ·2H<sub>2</sub>O, 0,05 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,0 g/L de Tris buffer, 0,027 g/L de NH<sub>4</sub>Cl, y 15,0 × 10<sup>-8</sup> g/L de vitamina B12. Ver también US 7,989,195.

En Pyle *et al.* (D. J. Pyle, R. a Garcia, Z. Wen, Producing docosahexaenoic acid (DHA)-rich algae from biodiesel-derived crude glycerol: effects of impurities on DHA production and algal biomass composition, *J. Agric. Food Chem.* **56**, 3933–9 (2008)) se utilizó un cultivo similar con una combinación de glucosa:YE:peptona (10:1:1) en agua marina artificial compuesta por, entre otros, 18 g/L de NaCl, 2,44 g/L de MgSO<sub>4</sub> ·7H<sub>2</sub>O, 0,6 g/L de KCl, 1,0 g/L de NaNO<sub>3</sub>, 0,3 g/L de CaCl<sub>2</sub> ·2H<sub>2</sub>O, 0,05 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,0 g/L de Tris buffer, 0,027 g/L de NH<sub>4</sub>Cl, y 15,0 × 10<sup>-8</sup> g/L de vitamina B12. Tras el estudio de diversas fuentes de carbono, Pyle *et al.* llegan a la conclusión de que el uso de glicerol reciclado no presentaba grandes diferencias frente a la glucosa.

En Huang *et al.* (T. Y. Huang, W. C. Lu, I. M. Chu, A fermentation strategy for producing docosahexaenoic acid in *Aurantiochytrium limacinum* SR21 and increasing C22:6 proportions in total fatty acid, *Bioresour. Technol.* **123**, 8–14 (2012)) se estudió la relación entre la fuente de carbono y las fuentes de nitrógeno, llegando a la conclusión de que el cultivo que optimiza la producción de DHA contiene como fuentes de carbono y de nitrógeno una mezcla de 100 g/L de glicerol, 40 g/L de extracto de levadura (YE) y 40 g/L de peptona, el decir, en proporciones 10:4:4. El rendimiento obtenido fue equivalente a 0,69 g biomasa/g de glicerol.

En Rosa *et al.* (Rosa SM, Soria MA, Vélez CG, Galvagno MA. Improvement of a two-stage fermentation process for docosahexaenoic acid production by *Aurantiochytrium limacinum* SR21 applying statistical experimental designs and data analysis. *Bioresource Technology* **101**:2367–74 (2010)) se propone un sistema en 4 fases, en donde los dos parámetros fundamentales son la cantidad de inóculo y unas proporciones C:N de 55:1, en donde se propone el licor de maíz fermentado (CSL) como fuente de nitrógeno en sustitución de YE. Los rendimientos máximos de DHA son de 100 mg/L con tasas de crecimiento máximas de 0,11 h<sup>-1</sup>. Obtienen un enriquecimiento de DHA en el total de los lípidos, pero se pierde gran cantidad de biomasa al avanzar por las diferentes fases, limitando su utilidad.

En Ganuza *et al.* (E. Ganuza, M. S. Izquierdo, Lipid accumulation in *Schizochytrium* G13/2S produced in continuous culture, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**, 985–990 (2007)) se ha estudiado la estrategia de cultivo continuo para la cepa *Schizochytrium* G13/2S con proporciones glucosa:YE:peptona de 10:1,25:2 en agua marina artificial compuesta por, entre otros, 12,5 g/L de NaCl, 2,5 g/L de MgSO<sub>4</sub> ·7H<sub>2</sub>O, 0,5 g/L de KCl, 0,1 g/L de CaCl<sub>2</sub>, 0,5 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. El género *Aurantiochytrium* también se denominaba en el pasado *Schizochytrium*.

Existe por lo tanto un interés permanente en mejorar la eficiencia de los procesos de fermentación dirigidos a producir DHA.

**Breve Descripción de la Invención**

La presente invención proporciona un medio que incrementa la productividad general, facilita las operaciones y reduce el coste del proceso de obtención del DHA. Concretamente, incrementa un 53% la producción de DHA y un 38% la de biomasa respecto a tecnologías anteriores. Al mismo tiempo, el medio de cultivo utilizado es un 30% más económico.

Un primer aspecto de la invención es por tanto un cultivo para la producción de DHA (el cultivo de la invención) que comprende al menos un alga productora de DHA de la clase de los *Laberintulidos*, al menos una fuente de carbono, al menos un extracto de levadura y una o más fuentes secundarias de nitrógeno seleccionadas del grupo que consiste en triptona, licor de maíz fermentado, peptona y casaminoácido, caracterizado porque la proporción entre la concentración de la suma de fuentes secundarias de nitrógeno en gramos por litro de cultivo y la concentración de la fuente de carbono en gramos por litro de cultivo está comprendida entre 0,005 y 0,4, y la proporción entre la concentración del extracto de levadura en gramos por litro de cultivo y la concentración de la fuente de carbono en gramos por litro de cultivo está comprendida entre 0,008 y 1, y en donde la proporción entre la concentración de la suma de fuentes secundarias de nitrógeno en gramos por litro de cultivo y la concentración del extracto de levadura en gramos por litro de cultivo está comprendida entre 0,007 y 0,6.

El Rendimiento de biomasa producido respecto a cantidad de fuente de carbono inicial, es mayor, así como los rendimientos de DHA y biomasa. Por ejemplo, Huang *et al.*, comentado anteriormente, obtiene 0,69 g de biomasa por g de fuente de carbono, pero proporciones glicerol:YE:peptona de 10:4:4. Los inventores han descubierto que una variación entre la cantidad de las distintas fuentes de nitrógeno conduce a rendimientos sorprendentemente altos de hasta 0,8 g de biomasa por g de fuente de carbono. Es decir, un mayor rendimiento con una menor cantidad de fuentes de nitrógeno.

Un aspecto adicional de la invención es por tanto un procedimiento para la producción de DHA que comprende cultivar el cultivo de la invención. Un aspecto adicional se refiere al uso del cultivo de la invención para la producción de DHA.

Un aspecto adicional de la invención es un procedimiento para la preparación del cultivo de la invención que comprende mezclar los componentes en las cantidades indicadas.

A continuación se describen en detalle aspectos y realizaciones adicionales de la invención.

**Descripción de la invención**

**Definiciones**

En la presente invención la indicación de una concentración en “g/L” debe entenderse en su sentido habitual de gramos del componente dado por cada litro de cultivo. La indicación de

una concentración “mM” se debe entender como milimoles de la especie en cuestión por cada litro de cultivo.

### Cultivo

5 El medio de cultivo desarrollado para la presente invención, además de proporcionar mayores productividades, es mucho más sencillo que los descritos hasta el momento. Por ejemplo, es posible esterilizar todos los componentes de forma simultánea, algo que simplifica mucho las operaciones. Así, el medio de cultivo puede opcionalmente no comprender al menos uno de los compuestos que se seleccionan del grupo que consiste en  
10 KCl, NaNO<sub>3</sub> y Vitamina B12, y NH<sub>4</sub>Cl. Estos componentes han venido formando parte de los cultivos utilizados para la familia de los *Laberintulidos*, y se han considerado que tienen un efecto positivo en las productividades, tal y como se describe, por ejemplo, en el documento de Chi *et al* discutido arriba. Los inventores han encontrado ahora que sin embargo se puede prescindir de su uso sin afectar a la productividad, simplificando el cultivo y  
15 haciéndolo más práctico para su aplicación industrial.

Además, se ha encontrado que otros componentes pueden estar presentes en cantidades sorprendentemente bajas sin afectar a la eficiencia del proceso. Así, el cultivo de la invención puede incluir una fuente de catión calcio, por ejemplo, en forma de CaCl<sub>2</sub>, aunque el experto en la materia puede buscar sales alternativas de calcio adecuadas para el cultivo  
20 de la invención. Sin embargo, en contra de los niveles establecidos hasta el momento, opcionalmente el cultivo comprende CaCl<sub>2</sub> en una concentración de entre 0,01 y 1,00 g/L. Otros rangos alternativos de concentración de CaCl<sub>2</sub> son entre 0,05 y 0,70 g/L, entre 0,10 y 0,40 g/L, preferiblemente entre 0,15 y 0,30 g/L. El cultivo de la invención también incluye opcionalmente una fuente de anión sulfato, cuya concentración no es crítica, y su fuente  
25 suele encontrarse en la fuente de nitrógeno, pero puede aportarse por medio de la adición de otras sales como el MgSO<sub>4</sub>. Por ejemplo, el cultivo de la invención puede comprender una fuente de catión magnesio, por ejemplo MgSO<sub>4</sub>, en una concentración de MgSO<sub>4</sub> comprendida entre 0,01 y 0,30 g/L, preferiblemente entre 0,05 y 0,20 g/L. Por ejemplo, la concentración de MgSO<sub>4</sub> está comprendida entre 0,01 y 0,20 g/L y la concentración de  
30 CaCl<sub>2</sub> está comprendida entre 0,10 y 0,20 g/L. Alternativamente, la concentración de MgSO<sub>4</sub> está comprendida entre 0,01 y 0,20 g/L, la concentración de CaCl<sub>2</sub> está comprendida entre 0,10 y 0,20 g/L, y el cultivo está sustancialmente libre de KCl. En general se prefiere que la concentración de MgSO<sub>4</sub> en el cultivo de la invención sea menor de 1 g/L. En general se prefiere que la concentración de CaCl<sub>2</sub> en el cultivo de la invención sea menor de 0,25 g/L.  
35 Más aún, los inventores han determinado que la combinación de una concentración óptima de CaCl<sub>2</sub> en ausencia de KCl proporciona resultados mejorados. Así, se prefiere que la

concentración de  $\text{CaCl}_2$  se encuentre entre 0,15 y 0,30 g/L al tiempo que la concentración de KCl es de 0 g/L.

Las fuentes de carbono que admite el cultivo de la invención son las habituales para los quimioorganotrofos, y en particular para la familia de los *Laberintulidos*. Los hidratos de carbono se consideran la fuente de carbono y energía más habitual, y algunos ejemplos no limitativos se seleccionan del grupo que consiste en hexosas (por ejemplo, glucosa fructosa o galactosa), pentosas (por ejemplo, arabinosa, xilosa, raminosa), disacáridos (por ejemplo, lactosa, sacarosa, maltosa), trisacáridos como la farinosa, polisacáridos (por ejemplo, almidón o glucógenos), alcoholes tales como el glicerol, sorbitol o el manitol, glucósidos (por ejemplo, salicina, y esculina) o mezclas de los mismos. La fuente de carbono puede ser una determinada por el experto en la materia, dependiendo de los materiales de partida disponibles en cada caso. Típicamente la fuente de carbono es glicerol, preferiblemente glicerol de reciclaje, por ejemplo, derivado de la producción de biodiesel. Dicho glicerol puede ser opcionalmente pre-tratado ajustando su pH a 5,0-7,5 para hidrolizar posibles jabones presentes y que éstos precipiten. Este pre-tratamiento se describe en los documentos de Chi o Pyle comentados arriba.

El cultivo de la presente invención se puede aplicar a las algas de la familia de los *Laberintulidos* con capacidad de sintetizar DHA. Por ejemplo, se puede aplicar en algas del género *Aurantiochytrium*, por ejemplo, un alga que selecciona del grupo que consiste en *Aurantiochytrium limacinum*, *Aurantiochytrium mangrovei* y mezclas de las mismas. Por ejemplo, se aplica a las *Aurantiochytrium limacinum SR21* (I. Bonilla, M. Garcia-González, P. Mateo, Boron requirement in cyanobacteria: its possible role in the early evolution of photosynthetic organisms., *Plant Physiol.* **94**, 1554–60 (1990)). También se puede aplicar a las algas pertenecen a las especies que se seleccionan del grupo que consiste en *Sicyoidochytrium minutum*, *Botryochytrium radiatum* (por ejemplo la cepa *NBRC104107*) y *Ulkenia amoeboides* (por ejemplo la cepa *NBRC 104106*).

El cultivo de la presente invención puede incluir un "buffer" para controlar las alteraciones de pH producidas por la actividad de los microorganismos. La utilización de una sal de fosfato, preferiblemente  $\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{NaOH}$ , permite alcanzar concentraciones elevadas de biomasa. No se han apreciado diferencias significativas entre la generación de biomasa y producción DHA a diferentes valores de pH, y el cultivo de la invención tiene normalmente un pH de entre 5 y 7,5. Preferiblemente, el pH es aproximadamente 6,5 cuando se utiliza el  $\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{NaOH}$  como buffer, el cual permite alcanzar valores elevados de biomasa.

El cultivo de la invención contiene suficiente NaCl como para reproducir las salinidades del ecosistema natural en el que se encuentran las algas. El cultivo de la invención admite variaciones de entre 1 y 60 g/L, Por ejemplo entre 10 y 30 g/L.

El cultivo de la presente invención incluye por tanto una fuente de nitrógeno que comprende extracto de levadura (YE) y una fuente secundaria de nitrógeno (SN<sub>2</sub>) en proporciones específicas.

5 Dicha fuente secundaria de nitrógeno es típicamente triptona, preferiblemente de caseína. Puede conseguirse en forma de polvo soluble en agua procedente de digestión enzimática de caseína y contiene diversas fuentes de nitrógeno (por ejemplo, aminoácidos o péptidos). El cultivo de la presente invención admite un amplio rango de variabilidad en el contenido y cantidades de nitrógeno presente en la triptona, y el experto puede elegir entre distintos  
10 disponibles comercialmente. Por ejemplo, el contenido de nitrógeno en la triptona oscila entre el 5% y 50%, por ejemplo entre el 7 % y el 20 %, preferiblemente entre el 10% y el 14% con respecto al peso total de la triptona.

La fuente secundaria de nitrógeno también puede estar compuesta por licor de maíz fermentado, peptona o casaminoácido, todos ellos comercialmente disponibles con  
15 contenidos en nitrógeno como los indicados para la triptona. Las peptonas son productos de la hidrólisis ácida o enzimática de proteínas de origen animal o vegetal (carne, soja, caseína, gelatina, harina de maíz y girasol). Los productos de hidrólisis pueden tener longitud variable, desde aminoácidos, hasta dipéptidos, tripéptidos, polipéptidos, albumosas, proteosas. Los casaminoácidos son una mezcla de aminoácidos y pequeños péptidos  
20 obtenidos de la hidrólisis ácida de la caseína, y se diferencian de la triptona en que predominantemente contienen aminoácidos libres. El licor de maíz fermentado (CSL en sus siglas en inglés) es un subproducto de la molienda del maíz que se utiliza como fuente de nitrógeno.

Los extractos de levadura son mezclas complejas de nutrientes. El cultivo de la presente  
25 invención admite diferentes fuentes/orígenes, y el proceso es robusto a variaciones. Los extractos de levadura suelen presentarse como un polvo soluble en agua procedente de autólisis de levaduras que contiene esencialmente fuentes de nitrógeno (aminoácidos y péptidos), así como otros componentes como vitaminas o carbohidratos. Por ejemplo, el contenido de nitrógeno en el extracto de levadura oscila entre el 5% y 50%, por ejemplo  
30 entre el 7 % y el 20 %, preferiblemente entre el 9% y el 12% con respecto al peso total del extracto de levadura. Los extractos de levadura aportan además oligoelementos tales como por ejemplo factores de crecimiento, vitaminas como la tiamina, la riboflavina y la biotina. El contenido en nitrógeno se calcula de acuerdo con la cuantificación que proporciona el proveedor en cada caso o se puede calcular siguiendo el método de Kjeldahl (STM E258 -  
35 07(2015)).

El cultivo de la presente invención permite rendimientos sorprendentemente altos gracias al control preciso de la proporción de las diferentes fuentes de nitrógeno frente a la fuente de carbono y entre sí, concretamente aquellas en las que  $[SN_2]/[C] = 0,005-0,4$ ,  $[YE]/[C] = 0,008-1$  y  $[SN_2]/[YE] = 0,007-0,6$ , en claro contraste con los cultivos utilizados anteriormente, en los que bien se utiliza una única fuente de nitrógeno o bien se utilizan dos que se encuentran en las mismas proporciones; a veces incluso en donde la cantidad de fuente de nitrógeno secundaria es mayor que la cantidad de extracto de levadura. Así, se prefiere que la proporción  $[YE]/[C]$  esté comprendida entre 0,08 y 0,4 al tiempo que la proporción  $[SN_2]/[C]$  sea de entre 0,01 y 0,1, por ejemplo, que dichas proporciones sean de entre 0,1 y 0,3 y de entre 0,02 y 0,08, respectivamente. Al contrario que en los cultivos descritos hasta el momento, en donde la relación entre el extracto de levadura y una fuente secundaria de nitrógeno no tenía importancia, los inventores también han encontrado que el control de las proporciones entre ambos tiene un impacto sorprendente en la productividad del proceso. Así, la proporción entre la concentración de la suma de fuentes secundarias de nitrógeno en gramos por litro de cultivo y la concentración del extracto de levadura en gramos por litro de cultivo ( $[SN_2]/[YE]$ ) puede también estar comprendida entre 0,05 y 0,7, también entre 0,08 y 0,5, más preferiblemente entre 0,09 y 0,3. Los mejores resultados se han obtenido con las proporciones  $[SN_2]/[C]=0,04$  y  $[YE]/[C]=0,23$ , de acuerdo la siguiente ecuación:

$$\text{Fuente } N_2 \text{ (g)} = (2,3g \text{ Extracto levadura} * [C]/10) + (0,4g \text{ } SN_2 * [C]/10)$$

En donde dicha fuente secundaria de nitrógeno es preferiblemente triptona.

La optimización de la composición de la presente invención permite prescindir de fuentes de catión cobalto y del  $H_3BO_3$ , simplificando aún más su producción, y reduciendo el riesgo que conlleva la manipulación de estos compuestos y haciendo el proceso más económico, así como evitando la proliferación de especies contaminantes que dependen del catión cobalto para su supervivencia.

Se prefiere que el cultivo de la invención comprenda Glutamato, por ejemplo glutamato monosódico. A medida que se aumenta la concentración de glutamato en el medio de cultivo se observa una mayor producción y acumulación de pigmentos, tal y como se discute con mayor detalle más adelante. El cultivo de la presente invención puede comprender por tanto una concentración de glutamato mayor de 6 mM o mayor de 18 mM, preferiblemente entre 6 mM y 500 mM. Por ejemplo, la concentración de glutamato sódico puede ser de entre 1 g/L y 20 g/L, más preferiblemente entre 2 y 15 g/L. Los mejores resultados se han obtenido con concentraciones superiores a 6 g/L. Los pigmentos obtenidos son típicamente tetraterpenos (por ejemplo carotenos y xantofilas), y se pueden utilizar en diversas aplicaciones, como por ejemplo, antioxidante o colorante en diversas industrias como la farmacéutica, alimentaria,

pintura. Incluso es posible utilizar el DHA y los pigmentos como un único producto. Los pigmentos protegen el DHA gracias a sus propiedades antioxidantes.

### Proceso

5 El cultivo de la presente invención se puede aplicar a procesos en régimen discontinuo (*batch*), discontinuo alimentado (*fed-batch*) y en continuo, independientemente de que se utilice una, dos o más fases, y puede depender del material y productos de partida disponibles. Los mejores resultados se han obtenido con procesos continuos debido a la facilidad de procesado y a la posibilidad de tratar menores volúmenes. El proceso continuo  
10 facilita además el escalado de factores como la aeración y la agitación.

Se prefiere que el proceso de la invención sea continuo con dos o más fases. En la primera fase se aplican condiciones que optimizan la producción de biomasa, es decir, del número de células. En la segunda se establecen las mejores condiciones para estimular la producción de DHA. Normalmente el proceso tiene lugar en tanques, aunque otros medios  
15 disponibles también son apropiados. Tanto la primera como la segunda fase pueden tener lugar en uno o más tanques, de acuerdo con las condiciones que se buscan y el tamaño de reactores disponible.

Por tanto, en el primer tanque es ventajoso buscar condiciones que garanticen una tasa de crecimiento tan alta como sea posible, a fin de ofrecer la máxima producción de biomasa.  
20 Esta estrategia puede comprender una o más de las siguientes condiciones:

- Las concentraciones de la fuente de carbono son típicamente de entre 10g/L y 100 g/L. la elección apropiada de la cantidad de fuente de nitrógeno ha permitido en este caso utilizar cantidades de fuente de carbono particularmente bajas, mejorando aún más la eficiencia del proceso. Preferiblemente se utilizan concentraciones de fuente  
25 de carbono de 40-60 g/L, preferiblemente glicerol reciclado.
- Concentraciones de las diferentes fuentes de nitrógeno de modo que las proporciones frente a la fuente de carbono y entre sí, sean las proporciones inventivas discutidas anteriormente:  $[SN_2]/[C] = 0,005-0,4$ ,  $[YE]/[C] = 0,008-1$  y  $[SN_2]/[YE] = 0,007-0,6$
- 30 ▪ Una temperatura de 15-35°C, preferiblemente 15-30°C, alternativamente entre 20-35°C, más preferiblemente entre 25-28°C, para estimular la producción de biomasa frente a DHA.
- La agitación debe ser suficiente como para garantizar una buena disponibilidad de oxígeno, y puede depender de diversos factores como, por ejemplo, la escala del  
35 reactor, que el experto en la materia puede ajustar. Valores típicos en esta primera etapa son de entre 400 rpm y 800 rpm, por ejemplo entre 550 rpm y 700 rpm

- La aireación debe ser lo suficientemente elevada como para alcanzar una buena producción de biomasa sin provocar todavía excesiva producción de DHA. Valores típicos se encuentran entre 1 y 5 L/min, preferiblemente entre 2 y 4 L/min.
- Volumen del reactor: El volumen del primer reactor puede estar comprendido entre un 5% y un 25%, preferiblemente entre el 10% y el 20% del volumen total del sistema.
- Conviene que la tasa de dilución sea tan alta como sea posible, para establecer una elevada tasa de crecimiento. Esto repercutirá en la productividad final de DHA. Se puede trabajar entre: 0,0211 a 0,070 h<sup>-1</sup>. La óptima sería entre 0,050 y 0,060 h<sup>-1</sup>.

5

10

Por lo tanto, todas las condiciones están encaminadas a maximizar la producción de biomasa, y el experto en la materia puede aplicar distintas variaciones dependiendo de las circunstancias de cada caso.

En la segunda fase se busca la máxima producción de DHA, aumentando su contenido en las células que se han producido en la primera fase. Para ello se busca un tiempo de residencia adecuado para acumular cantidades significativas de DHA. Esto se puede conseguir, por ejemplo, reduciendo la tasa de dilución e incrementando así el volumen en la segunda fase, lo cual se puede hacer en un único tanque si es suficientemente grande, o en varios tanques. De esta forma se provoca una mayor residencia de las células en esta fase. La dilución en esta segunda fase se establece preferentemente entre 0,0001h<sup>-1</sup> y 0,0100h<sup>-1</sup>, preferiblemente entre 0,001h<sup>-1</sup> y 0,010h<sup>-1</sup>. El volumen total en el o los tanques de esta segunda fase está pues preferiblemente comprendido entre el 75% y el 95%, preferiblemente entre el 80% y 90%, del volumen total del sistema. Condiciones que típicamente estimulan la producción de DHA son una o más de las siguientes:

15

20

- Modulación de la concentración de la fuente de carbono. Los inventores han encontrado que una concentración de glicerol menor que en la primera etapa, por ejemplo de entre 0,1 y 8 g/L, estimula de forma sorprendente la acumulación de ácidos grasos, un efecto que hasta el momento no se había observado en la literatura. Así, por ejemplo, se comprobó que al finalizar un cultivo, la adición de una pequeña cantidad de glicerol (hasta los 5g/l) aumento el rendimiento un 30%.
- Esta reducción en la concentración de la fuente de carbono puede venir acompañada de una menor temperatura a la utilizada en la primera fase, por ejemplo entre 10-20°C. En WO 2004/083442 se describe un proceso de fermentación en dos etapas en donde la segunda etapa comprende bajar la temperatura a 10°C, pero no se describe el efecto de la reducción de la concentración de la fuente de carbono.
- Una menor agitación, por ejemplo, entre 200 rpm y 500 rpm, o superior a 350 rpm para garantizar una buena disponibilidad de oxígeno.

25

30

35

- Una menor aireación, por ejemplo entre 0,1 y 1 g/min para estimular la producción de DHA de forma casi exclusiva.
- Concentración nula o despreciable de la fuente de nitrógeno.
- Al mismo tiempo, las condiciones de esta segunda fase pueden ser tales que provocan el estrés necesario como para provocar la generación de pigmentos en presencia de las cantidades adecuadas de glutamato. Estas condiciones implican por lo general baja disponibilidad de oxígeno y de temperaturas bajas.

Por tanto, los investigadores han encontrado que la combinación de una primera temperatura más elevada en la primera fase con una temperatura menor en la segunda, eleva la eficiencia en la producción de DHA de una forma sorprendente. En el estado de la técnica ya se había observado que una menor temperatura favorece la producción de DHA (Y. Taoka et al., Effects of cold shock treatment on total lipid content and fatty acid composition of *Aurantiochytrium limacinum* strain mh0186., *J. Oleo Sci.* **60**, 217–20 (2011)). No obstante, el crecimiento de la biomasa resultó ser tan bajo, que la productividad final hacía el proceso inviable para la escala industrial. Se intentó por otro lado un choque térmico, es decir, almacenar la biomasa a temperaturas bajas después de una fermentación a mayor temperatura, sin obtener un incremento en la cantidad de DHA producido.

Por otro lado, la presencia en bajas concentraciones de la fuente de carbono en la segunda fase (bien porque se adiciona o porque proviene de la primera fase) permite que los rendimientos de DHA aumenten alrededor de entre un 5% y un 15%. El proceso de la invención puede comprender una tercera fase en la que se almacena el cultivo a temperaturas menores de 10°C, preferiblemente menores de 7°C, en presencia de glicerol.

Como ocurre con la temperatura, en el caso del oxígeno las condiciones para una mejor producción de DHA y biomasa, no convergen. Muchos trabajos, han identificado que cuando la disponibilidad de oxígeno se baja, aumenta la concentración de DHA. Por ejemplo, en la primera fase la concentración de oxígeno disuelto, puede ser tan alta como sea posible, por ejemplo puede estar entre el 2 y el 70%, preferiblemente a más del 20%, mientras que puede bajar a menos del 2% durante la segunda fase.

Hay que añadir que si se combinan temperaturas de 15°C o menores, así como una baja disponibilidad de oxígeno, por ejemplo de entre un 0,5 y el 20 %, preferiblemente entre el 1 y el 10 %, se generan los pigmentos con capacidad antioxidante anteriormente mencionados. Este fenómeno es importante, pues protege los DHA en el momento de la extracción. Por tanto, el proceso de la invención puede ser un proceso continuo en donde la primera fase tiene lugar a una temperatura y concentración de oxígeno mayores que en segunda fase, y la segunda fase tiene lugar en presencia de una concentración de glutamato mayor de 10 mM. Alternativamente, la primera fase tiene lugar a una temperatura de entre 20°C y 35°C,

en presencia de una concentración de oxígeno de más del 20%, y la segunda fase a una temperatura menor de 20°C, en presencia de una concentración de oxígeno menor del 20% y una concentración de glutamato mayor de 10 mM.

Preferiblemente, el procedimiento de la invención comprende una etapa que comprende extraer las moléculas orgánicas resultantes.

### Aplicaciones

El DHA tiene importantes aplicaciones industriales en las industrias de la alimentación y de la salud. Por tanto, el producto puro (o con un nivel de pureza adecuado) de DHA u otros lípidos tienen valor. Uno de los problemas que presenta la preparación del DHA con la pureza requerida, son los procesos de oxidación que degradan el producto. Como se comenta más arriba, los inventores han encontrado ahora que bajo las condiciones adecuadas la producción de DHA puede ir acompañada de la producción de pigmentos, los cuales tienen propiedades antioxidantes y actúan como un protector del DHA. La elevada producción de pigmentos alcanzada mediante el uso del cultivo de la invención y/o de los procedimientos de fermentación aquí descritos, hacen del producto de fermentación de la invención una mezcla única con unas propiedades características que permite obtener DHA con menores niveles de oxidación y hace su manipulación más sencilla. Es por tanto un aspecto adicional de la invención un producto de fermentación que comprende al menos un alga de la clase de los *Laberintulidos*, DHA y un pigmento, preferiblemente un tetraterpeno. Esta mezcla compleja tiene unas características únicas y se puede describir como el producto de fermentación que comprende al menos un alga de la clase de los *Laberintulidos*, DHA y al menos un pigmento, preferiblemente un tetraterpeno, en donde dicho producto de fermentación es obtenible por un procedimiento que comprende cultivar un cultivo que comprende al menos un alga productora de DHA de la clase de los *Laberintulidos* :

(i) durante una primera fase en presencia de al menos una fuente de carbono, al menos un extracto de levadura y una o más fuentes secundarias de nitrógeno seleccionadas del grupo que consiste en triptona, licor de maíz fermentado, peptona y casaminoácido, caracterizado porque la proporción en el cultivo entre la concentración de la suma de fuentes secundarias de nitrógeno en gramos por litro de cultivo y la concentración de la fuente de carbono en gramos por litro de cultivo está comprendida entre 0,005 y 0,4, y la proporción entre la concentración del extracto de levadura en gramos por litro de cultivo y la concentración de la fuente de carbono en gramos por litro de cultivo está comprendida entre 0,008 y 1, y en donde la proporción entre la concentración de la suma de fuentes secundarias de nitrógeno en gramos por litro de cultivo y la concentración del extracto de levadura en gramos por litro

de cultivo está comprendida entre 0,007 y 0,6; a una temperatura mayor de 20°C y una concentración de oxígeno mayor del 20%; y

(ii) durante una segunda fase a una temperatura menor de 20°C, en presencia de una concentración menor de oxígeno del 20% y una concentración de glutamato mayor de 10 mM.

Preferiblemente, el producto de fermentación tiene una concentración de dichos pigmentos, como por ejemplo Astaxantina, superior a 20 µg de pigmento por g de biomasa, preferiblemente mayor de 30 µg de pigmento por g de biomasa. Típicamente, la concentración del pigmento se encuentran entre 20 y 300 µg de pigmento por g de biomasa.

Estas elevadas concentraciones de pigmento se obtienen directamente del proceso de fermentación sin necesidad de adición externa, y cuyas propiedades antioxidantes durante el proceso de fermentación y la posterior manipulación, permiten obtener más fácilmente un DHA de mayor pureza. Estas composiciones que comprende DHA y al menos un pigmento, preferiblemente un tetraterpeno, en concentraciones superiores a 20 µg de pigmento por g de biomasa constituyen también un aspecto de la presente invención, como también lo es una composición que comprende DHA y al menos un pigmento, preferiblemente un tetraterpeno, en donde dicha composición es obtenible por un procedimiento que comprende cultivar un cultivo que comprende al menos un alga productora de DHA de la clase de los *Laberintulidos*:

(i) durante una primera fase en presencia de al menos una fuente de carbono, al menos un extracto de levadura y una o más fuentes secundarias de nitrógeno seleccionadas del grupo que consiste en triptona, licor de maíz fermentado, peptona y casaminoácido, caracterizado porque la proporción en el cultivo entre la concentración de la suma de fuentes secundarias de nitrógeno en gramos por litro de cultivo y la concentración de la fuente de carbono en gramos por litro de cultivo está comprendida entre 0,005 y 0,4, y la proporción entre la concentración del extracto de levadura en gramos por litro de cultivo y la concentración de la fuente de carbono en gramos por litro de cultivo está comprendida entre 0,008 y 1, y en donde la proporción entre la concentración de la suma de fuentes secundarias de nitrógeno en gramos por litro de cultivo y la concentración del extracto de levadura en gramos por litro de cultivo está comprendida entre 0,007 y 0,6; a una temperatura mayor de 20°C y una concentración de oxígeno mayor del 20%;

(ii) durante una segunda fase a una temperatura menor de 20°C, en presencia de una concentración de oxígeno menor del 20% y una concentración de glutamato mayor de 10 mM;

(iii) extraer de la biomasa resultante al menos los lípidos y pigmentos resultantes.

Por otra parte, la invención no está limitada a las realizaciones concretas que se han descrito sino abarca también, por ejemplo, las variantes que pueden ser realizadas por el experto medio en la materia (por ejemplo, en cuanto a la elección de materiales, dimensiones, componentes, configuración, etc.), dentro de lo que se desprende de las reivindicaciones.

**Ejemplos**

Los siguientes ejemplos muestran la eficacia y las mejoras de un cultivo de acuerdo con la presente invención frente a un cultivo preparado de acuerdo con el estado de la técnica (Medio estándar). Los cultivos se prepararon de acuerdo con las composiciones indicadas abajo en la Tabla 1.

Componente	Concentración	Componente	Concentración
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.85 g/L	Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	0.20 mM
NaOH	0.14 g/L	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1 mM
NaCl	18 g/L	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.097 mM
CaCl <sub>2</sub>	0.19 g/L	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	7 μM
MgSO <sub>4</sub>	0.1 g/L	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.83 mg/L
Extracto de levadura	2.3·(C/10)	<b>Medio de la presente invención</b>	
Triptona	0.4·(C/10)		
Fuente de carbono	Valor de C entre 10 g/L y 100 g/L		
Componente	Concentración	Componente	Concentración
Tris	1 g/L	Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	0.20 mM
CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	1 g/L	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1 mM
NaCl	18 g/L	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.097 mM
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.5 g/L	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	7 μM
CaCl <sub>2</sub>	0.3 g/L	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	2 μm
KCl	0.6 g/L	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.83 mg/L
NaNO <sub>3</sub>	1 g/L	FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.018 mM
NH <sub>4</sub> Cl	0.03 g/L	<b>Medio estándar</b>	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.05 g/L		
Extracto de levadura	1 g/L		
Peptona	1 g/L		
Vitamina B <sub>12</sub>	0.15 μg/L		
Fuente de carbono	Valor de C entre 10 g/L y 100 g/L		

Tabla 1: composición de los cultivos

Como se puede ver, el medio de la presente invención presenta una concentración de extracto de levadura de 0,23 g YE/L por cada g/L de fuente de carbono usado, una concentración de Triptona de 0,04 g/L por cada g/L de fuente de carbono usado, siendo por tanto la proporción entre la concentración de la suma de fuentes secundarias de nitrógeno respecto de la concentración del extracto de levadura de 0,17. Sin embargo, esta proporción en el medio estándar es de 1

Estos dos medios se compararon en diferentes condiciones. Así, se comparó un medio estándar en modo batch (dos experimentos en las mismas condiciones), y uno estándar en continuo (Chemostat) con uno según la presente invención en modo continuo (Chemostat) bajo las mismas condiciones de operación. Además, estos dos últimos se compararon con un doble reactor utilizando un medio según la presente invención (Chemostat).

Como puede observarse de los resultados mostrados en la tabla 2, los medios según la presente invención proporcionan mayores productividades tanto en modo batch, como en modo continuo.

Microorganismo	Estrategia de cultivo	Productividad de biomasa (g / h)	Productividad de biomasa volum. (g /L-h)	Productividad biomasa (g DHA / g de biomasa)	Rendimiento (g DHA / g de biomasa)	Productividad DHA (g/h)	Concentrac. (g DHA/L)	Pigmento	Medio utilizado
<i>A. limacinum</i> SR21 / MYA-1381	Batch	0,28*	NA	0,170 ± 0,02	0,170 ± 0,02	0,05*	3,9	-	Estándar
<i>A. limacinum</i> SR21 / MYA-1381	Batch	0,62*	NA	0,230 ± 0,02	0,230 ± 0,02	0,11*	9,5	+++	Optimizado
<i>A. limacinum</i> SR21 / MYA-1381	Chemostat	1,04	0,12	0,150 ± 0,01	0,150 ± 0,01	0,16	1,5	-	Estándar
<i>A. limacinum</i> SR21 / MYA-1381	Chemostat	1,19	0,70	0,191 ± 0,023	0,191 ± 0,023	0,23	8,6	-	Optimizado
<i>A. limacinum</i> SR21 / MYA-1381	Chemostat (Multitanque)	1,24	0,31	0,176 ± 0,013	0,176 ± 0,013	0,22	8,5	++	Optimizado

Tabla 2

\* Indica cálculo aproximado de productividades en batch, para ser comparable al continuo (descrito en los siguientes párrafos)

Comparando estrategias de cultivo, se puede ver que el medio según la presente invención tiene un efecto positivo en las productividades también cuando se utiliza un sistema continuo, proporcionando los nutrientes necesarios para mantener un crecimiento sostenido, incluso en situaciones de elevada concentración de biomasa. Por otro lado, con el sistema multi-tanque se pueden incluso producir pigmentos y DHA de forma simultánea y sostenida. Además, el coste por litro de medio se reduce un 30%.

Aspectos y realizaciones de la invención pueden encontrarse en las siguientes cláusulas numeradas:

10 Clausula 1: Cultivo para la producción de DHA que comprende al menos un alga productora de DHA de la clase de los *Laberintulidos* , al menos una fuente de carbono, al menos un extracto de levadura y una o más fuentes secundarias de nitrógeno seleccionadas del grupo que consiste en triptona, licor de maíz fermentado, peptona y casaminoácido, caracterizado porque la proporción entre la concentración de la suma de fuentes secundarias de nitrógeno en gramos por litro de cultivo y la concentración de la fuente de carbono en gramos por litro de cultivo está comprendida entre 0,005 y 0,4, y la proporción entre la concentración del extracto de levadura en gramos por litro de cultivo y la concentración de la fuente de carbono en gramos por litro de cultivo está comprendida entre 0,008 y 1, y en donde la proporción entre la concentración de la suma de fuentes secundarias de nitrógeno en gramos por litro de cultivo y la concentración del extracto de levadura en gramos por litro de cultivo está comprendida entre 0,007 y 0,6.

25 Clausula 2: Cultivo para la producción de DHA que comprende al menos un alga de la clase de los *Laberintulidos* en presencia de al menos una fuente de carbono y de al menos una fuente de nitrógeno, caracterizado porque comprende  $MgSO_4$  en una concentración menor de 1 g/L.

Clausula 3: Cultivo para la producción de DHA que comprende al menos un alga de la clase de los *Laberintulidos* en presencia de al menos una fuente de carbono y de al menos una fuente de nitrógeno, caracterizado porque comprende  $CaCl_2$  en una concentración menor de 0,25 g/L.

30 Clausula 4: Cultivo para la producción de DHA que comprende al menos un alga de la clase de los *Laberintulidos* en presencia de al menos una fuente de carbono y de al menos una fuente de nitrógeno, caracterizado porque no contiene uno o más de los compuestos que se seleccionan del grupo que consiste en KCl,  $NaNO_3$  y vitamina B12.

Cláusula 5: Cultivo según una cualquiera de las cláusulas 2, 3 o 4 que comprende al menos una fuente de carbono, al menos un extracto de levadura y una o más fuentes secundarias de nitrógeno seleccionadas del grupo que consiste en triptona, licor de maíz fermentado, peptona y casaminoácido, caracterizado porque la proporción entre la concentración de la suma de fuentes secundarias de nitrógeno en gramos por litro de cultivo y la concentración de la fuente de carbono en gramos por litro de cultivo está comprendida entre 0,005 y 0,4, y la proporción entre la concentración del extracto de levadura en gramos por litro de cultivo y la concentración de la fuente de carbono en gramos por litro de cultivo está comprendida entre 0,008 y 1, y en donde la proporción entre la concentración de la suma de fuentes secundarias de nitrógeno en gramos por litro de cultivo y la concentración del extracto de levadura en gramos por litro de cultivo está comprendida entre 0,007 y 0,6.

Clausula 6: El cultivo según una cualquiera de las cláusulas anteriores en donde la proporción entre la concentración de la suma de fuentes secundarias de nitrógeno en gramos por litro de cultivo y la concentración del extracto de levadura en gramos por litro de cultivo está comprendida entre 0,09 y 0,3.

Cláusula 7: El cultivo según una cualquiera de las cláusulas anteriores que comprende al menos un alga del género *Aurantiochytrium*.

Cláusula 8: El cultivo según una cualquiera de las cláusulas anteriores que comprende un alga que selecciona del grupo que consiste en *Aurantiochytrium limacinum*, *Aurantiochytrium mangrovei* y mezclas de las mismas.

Cláusula 9: El cultivo según una cualquiera de las cláusulas anteriores en donde dicha fuente secundaria de nitrógeno comprende triptona.

Cláusula 10: El cultivo según una cualquiera de las cláusulas anteriores en donde dicha fuente de carbono comprende un compuesto que se selecciona del grupo que consiste en hexosas, pentosas, disacáridos, trisacáridos, polisacáridos, alcoholes, glucósidos o mezclas de los mismos.

Cláusula 11: El cultivo según una cualquiera de las cláusulas anteriores que comprende glicerol.

Cláusula 12: El cultivo según una cualquiera de las cláusulas anteriores que comprende glicerol reciclado.

Cláusula 13: El cultivo según una cualquiera de las cláusulas anteriores que comprende uno o más compuestos que se seleccionan del grupo que consiste en NaCl y un buffer.

Cláusula 14: El cultivo según una cualquiera de las cláusulas 1 o 6-13 que comprende  $MgSO_4$  en una concentración menor de 1 g/L.

Cláusula 15: El cultivo según una cualquiera de las cláusulas 1 o 6-14 que comprende  $\text{CaCl}_2$  en una concentración menor de 0,25 g/L.

Cláusula 16: El cultivo según una cualquiera de las cláusulas 1 o 6-15 que no contiene uno o más de los compuestos que se seleccionan del grupo que consiste en KCl,  $\text{NaNO}_3$  y vitamina B12.

Cláusulas preferidas serían una de las siguientes combinaciones de cláusulas:

Cláusula 17: 1, 6 y 14

Cláusula 18: 1, 6 y 15

Cláusula 19: 1, 6 y 16

Cláusula 20: Procedimiento para la producción de DHA que comprende cultivar un cultivo de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1-19.

Cláusula 21: El procedimiento según la cláusula 20 que es discontinuo, discontinuo alimentado o continuo.

Cláusula 22: El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas 20 o 21 que es continuo con al menos dos fases con distintas condiciones de cultivo.

Cláusula 23: El procedimiento continuo según la cláusula 22 en donde la primera fase tiene lugar a una temperatura y concentración de oxígeno mayores que en segunda fase, y la segunda fase tiene lugar en presencia de una concentración de glutamato mayor de 10 mM.

Cláusula 24: El procedimiento continuo según la cláusula 23 en donde la primera fase tiene lugar a una temperatura de entre 20°C y 35°C, en presencia de una concentración de oxígeno de más del 20%, y la segunda fase a una temperatura menor de 20°C, en presencia de una concentración menor del 20% y una concentración de glutamato mayor de 10 mM.

Cláusula 25: El procedimiento continuo según la cláusula 24 que comprende una tercera etapa a una temperatura menor que en la segunda etapa, preferiblemente por debajo de 10°C.

Cláusula 26: El procedimiento según una cualquiera de las cláusulas 20-25 que comprende una etapa que comprende extraer las moléculas orgánicas resultantes.

Cláusula 27: Un producto de fermentación que comprende al menos un alga de la clase de los *Laberintulidos*, DHA y un pigmento.

Cláusula 28: Un producto de fermentación que comprende al menos un alga de la clase de los *Laberintulidos*, DHA y al menos un pigmento, en donde dicho producto de fermentación es obtenible por un procedimiento que comprende cultivar un cultivo que comprende al menos un alga productora de DHA de la clase de los *Laberintulidos* :

(i) durante una primera fase en presencia de al menos una fuente de carbono, al menos un extracto de levadura y una o más fuentes secundarias de nitrógeno seleccionadas del grupo que consiste en triptona, licor de maíz fermentado, peptona y casaminoácido, caracterizado porque la proporción en el cultivo entre la concentración de la suma de fuentes secundarias de nitrógeno en gramos por litro de cultivo y la concentración de la fuente de carbono en gramos por litro de cultivo está comprendida entre 0,005 y 0,4, y la proporción entre la concentración del extracto de levadura en gramos por litro de cultivo y la concentración de la fuente de carbono en gramos por litro de cultivo está comprendida entre 0,008 y 1, y en donde la proporción entre la concentración de la suma de fuentes secundarias de nitrógeno en gramos por litro de cultivo y la concentración del extracto de levadura en gramos por litro de cultivo está comprendida entre 0,007 y 0,6; a una temperatura mayor de 20°C y una concentración de oxígeno mayor del 20%; y

(ii) durante una segunda fase a una temperatura menor de 20°C, en presencia de una concentración menor del 20% de oxígeno y una concentración de glutamato mayor de 10 mM.

Cláusula 29: El producto de la cláusula 28 en donde dicho pigmento es un tetraterpeno.

Cláusula 30: El producto según una cualquiera de las cláusulas 28 o 29 en donde la concentración de dicho pigmento es superior a 20 µg de pigmento por g de biomasa.

Cláusula 31: Una composición que comprende DHA y al menos un pigmento en concentraciones superiores a 20 µg de pigmento por g de biomasa.

Cláusula 32: Una composición que comprende DHA y al menos un pigmento, en donde dicha composición es obtenible por un procedimiento que comprende cultivar un cultivo que comprende al menos un alga productora de DHA de la clase de los *Laberintulidos* :

(i) durante una primera fase en presencia de al menos una fuente de carbono, al menos un extracto de levadura y una o más fuentes secundarias de nitrógeno seleccionadas del grupo que consiste en triptona, licor de maíz fermentado, peptona y casaminoácido, caracterizado porque la proporción en el cultivo entre la concentración de la suma de fuentes secundarias de nitrógeno en gramos por litro de cultivo y la concentración de la fuente de carbono en gramos por litro de cultivo está comprendida entre 0,005 y 0,4, y la proporción entre la concentración del extracto de levadura en gramos por litro de cultivo y la concentración de la fuente de carbono en gramos por litro de cultivo está comprendida entre 0,008 y 1, y en donde la proporción entre la concentración de la suma de fuentes secundarias de nitrógeno en gramos por litro de cultivo y la concentración del extracto de levadura en gramos por litro

de cultivo está comprendida entre 0,007 y 0,6; a una temperatura mayor de 20°C y una concentración de oxígeno mayor del 20%;

(ii) durante una segunda fase a una temperatura menor de 20°C, en presencia de una concentración menor del 20% y una concentración de glutamato mayor de 10 mM;

5 (iii) extraer de la biomasa resultante al menos los lípidos y pigmentos resultantes.

Cláusula 33: La composición según una cualquiera de las cláusulas 31 o 32 en donde la concentración de dicho pigmento es superior a 20 µg de pigmento por g de biomasa.

Cláusula 34: Procedimiento para la preparación del cultivo de la cláusula 1 que comprende mezclar en un medio acuoso al menos un alga productora de DHA de la clase de los  
10 *Laberintulidos*, al menos una fuente de carbono, al menos un extracto de levadura y una o más fuentes secundarias de nitrógeno seleccionadas del grupo que consiste en triptona, licor de maíz fermentado, peptona y casaminoácido de forma que la proporción entre la concentración de la suma de fuentes secundarias de nitrógeno en gramos por litro de cultivo y la concentración de la fuente de carbono en gramos por litro de cultivo está comprendida  
15 entre 0,005 y 0,4, y la proporción entre la concentración del extracto de levadura en gramos por litro de cultivo y la concentración de la fuente de carbono en gramos por litro de cultivo está comprendida entre 0,008 y 1, y en donde la proporción entre la concentración de la suma de fuentes secundarias de nitrógeno en gramos por litro de cultivo y la concentración del extracto de levadura en gramos por litro de cultivo está comprendida entre 0,007 y 0,6.

20 Cláusula 35: Procedimiento para la preparación de un cultivo según la cláusula 2 que comprende mezclar en un medio acuoso al menos un alga de la clase de los *Laberintulidos*, al menos una fuente de carbono, al menos una fuente de nitrógeno, y MgSO<sub>4</sub> en una concentración menor de 1 g/L.

Cláusula 36: Procedimiento para la preparación de un cultivo según la cláusula 3 que  
25 comprende mezclar en un medio acuoso al menos un alga de la clase de los *Laberintulidos*, al menos una fuente de carbono, al menos una fuente de nitrógeno, y CaCl<sub>2</sub> en una concentración menor de 0,25 g/L.

Cláusula 37: Procedimiento para la preparación de un cultivo según la cláusula 4 que  
30 comprende mezclar en un medio acuoso al menos un alga de la clase de los *Laberintulidos*, al menos una fuente de carbono, al menos una fuente de nitrógeno, en ausencia uno o más de los compuestos que se seleccionan del grupo que consiste en KCl, NaNO<sub>3</sub> y vitamina B12.

Cláusula 38: Uso del cultivo según una cualquiera de las cláusulas 1-19 para la producción de DHA.

Cláusula 39: Procedimiento para la producción de DHA que comprende cultivar un cultivo de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 17, 18 o 19.

### REIVINDICACIONES

- 1.- Cultivo para la producción de DHA que comprende al menos un alga productora de DHA de la clase de los *Laberintulidos*, al menos una fuente de carbono, al menos un extracto de levadura y una o más fuentes secundarias de nitrógeno seleccionadas del grupo que  
5 consiste en triptona, licor de maíz fermentado, peptona y casaminoácido, caracterizado porque la proporción entre la concentración de la suma de fuentes secundarias de nitrógeno en gramos por litro de cultivo y la concentración de la fuente de carbono en gramos por litro de cultivo está comprendida entre 0,005 y 0,4, y la proporción entre la concentración del extracto de levadura en gramos por litro de cultivo y la concentración de la fuente de  
10 carbono en gramos por litro de cultivo está comprendida entre 0,008 y 1, y en donde la proporción entre la concentración de la suma de fuentes secundarias de nitrógeno en gramos por litro de cultivo y la concentración del extracto de levadura en gramos por litro de cultivo está comprendida entre 0,007 y 0,6.
- 2.- El cultivo según la reivindicación 1, en donde la proporción entre la concentración de la suma de fuentes secundarias de nitrógeno en gramos por litro de cultivo y la concentración del extracto de levadura en gramos por litro de cultivo está comprendida entre 0,05 y 0,7.
- 3.- El cultivo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende al menos un alga del género *Aurantiochytrium*.
- 4.- El cultivo según la reivindicación 3, que comprende un alga que selecciona del grupo que  
20 consiste en *Aurantiochytrium limacinum*, *Aurantiochytrium mangrovei* y mezclas de las mismas.
- 5.- El cultivo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha fuente secundaria de nitrógeno comprende triptona.
- 6.- El cultivo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha fuente  
25 de carbono comprende un compuesto que se selecciona del grupo que consiste en hexosas, pentosas, disacáridos, trisacáridos, polisacáridos, alcoholes, glucósidos o mezclas de los mismos.
- 7.- El cultivo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha fuente de carbono comprende glicerol.
- 30 8.- El cultivo según la reivindicación 7, en donde dicho glicerol es glicerol reciclado.
- 9.- El cultivo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende uno o más compuestos que se seleccionan del grupo que consiste en NaCl y un buffer.
- 10.- El cultivo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende  $MgSO_4$  en una concentración menor de 1 g/L.

11.- El cultivo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende  $\text{CaCl}_2$  en una concentración menor de 0,25 g/L.

12.- El cultivo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que no contiene uno o más de los compuestos que se seleccionan del grupo que consiste en KCl,  $\text{NaNO}_3$  y vitamina B12.

13.- Procedimiento para la producción de DHA que comprende cultivar un cultivo que comprende al menos un alga productora de DHA de la clase de los *Laberintulidos*, en presencia de al menos una fuente de carbono, al menos un extracto de levadura y una o más fuentes secundarias de nitrógeno seleccionadas del grupo que consiste en triptona, licor de maíz fermentado, peptona y casaminoácido, caracterizado porque la proporción en el cultivo entre la concentración de la suma de fuentes secundarias de nitrógeno en gramos por litro de cultivo y la concentración de la fuente de carbono en gramos por litro de cultivo está comprendida entre 0,005 y 0,4, y la proporción entre la concentración del extracto de levadura en gramos por litro de cultivo y la concentración de la fuente de carbono en gramos por litro de cultivo está comprendida entre 0,008 y 1, y en donde la proporción entre la concentración de la suma de fuentes secundarias de nitrógeno en gramos por litro de cultivo y la concentración del extracto de levadura en gramos por litro de cultivo está comprendida entre 0,007 y 0,6.

14.- El procedimiento según la reivindicación 13, que es discontinuo, discontinuo alimentado o continuo.

15.- El procedimiento según la reivindicación 14, que es continuo con al menos dos fases con distintas condiciones de cultivo.

16.- El procedimiento continuo según la reivindicación 15, en donde la primera fase tiene lugar a una temperatura y concentración de oxígeno mayores que en segunda fase, y la segunda fase tiene lugar en presencia de una concentración de glutamato mayor de 10 mM.

17.- El procedimiento continuo según la reivindicación 16, en donde la primera fase tiene lugar a una temperatura de entre 20°C y 35°C, en presencia de una concentración de oxígeno de más del 20%, y la segunda fase a una temperatura menor de 20°C, en presencia de una concentración menor del 20% y una concentración de glutamato mayor de 10 mM.

18.- El procedimiento continuo según cualquiera de las reivindicaciones 15-17, que comprende una tercera fase a una temperatura menor que en la segunda fase, preferiblemente por debajo de 10°C.

19.- El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 13-18, que comprende una etapa que comprende extraer las moléculas orgánicas resultantes.

20.- Un producto de fermentación que comprende al menos un alga de la clase de los *Laberintulidos*, DHA y al menos un pigmento, en donde dicho producto de fermentación es obtenible por un procedimiento que comprende cultivar un cultivo que comprende al menos un alga productora de DHA de la clase de los *Laberintulidos* :

5 (i) durante una primera fase en presencia de al menos una fuente de carbono, al menos un extracto de levadura y una o más fuentes secundarias de nitrógeno seleccionadas del grupo que consiste en triptona, licor de maíz fermentado, peptona y casaminoácido, caracterizado porque la proporción en el cultivo entre la concentración de la suma de fuentes secundarias de nitrógeno en gramos por litro de cultivo y la concentración de la fuente de carbono en  
10 gramos por litro de cultivo está comprendida entre 0,005 y 0,4, y la proporción entre la concentración del extracto de levadura en gramos por litro de cultivo y la concentración de la fuente de carbono en gramos por litro de cultivo está comprendida entre 0,008 y 1, y en donde la proporción entre la concentración de la suma de fuentes secundarias de nitrógeno en gramos por litro de cultivo y la concentración del extracto de levadura en gramos por litro  
15 de cultivo está comprendida entre 0,007 y 0,6; a una temperatura mayor de 20°C y una concentración de oxígeno mayor del 20%; y

(ii) durante una segunda fase a una temperatura menor de 20°C, en presencia de una concentración menor del 20% y una concentración de glutamato mayor de 10 mM.

21.- El producto según la reivindicación 20, en donde dicho pigmento es un tetraterpeno.

20 22.- El producto según cualquiera de las reivindicaciones 20 o 21, en donde la concentración de dicho pigmento es superior a 20 µg de pigmento por g de biomasa

23.- Procedimiento para la preparación del cultivo definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-12, que comprende mezclar en un medio acuoso al menos un alga productora de DHA de la clase de los *Laberintulidos* , al menos una fuente de carbono, al  
25 menos un extracto de levadura y una o más fuentes secundarias de nitrógeno seleccionadas del grupo que consiste en triptona, licor de maíz fermentado, peptona y casaminoácido de forma que la proporción entre la concentración de la suma de fuentes secundarias de nitrógeno en gramos por litro de cultivo y la concentración de la fuente de carbono en  
30 gramos por litro de cultivo está comprendida entre 0,005 y 0,4, y la proporción entre la concentración del extracto de levadura en gramos por litro de cultivo y la concentración de la fuente de carbono en gramos por litro de cultivo está comprendida entre 0,008 y 1, y en donde la proporción entre la concentración de la suma de fuentes secundarias de nitrógeno en gramos por litro de cultivo y la concentración del extracto de levadura en gramos por litro de cultivo está comprendida entre 0,007 y 0,6.

24.- Uso del cultivo definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-12 para la producción de DHA.



- ②① N.º solicitud: 201531814  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 15.12.2015  
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N1/12** (2006.01)  
**C12P7/40** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2015150716 A2 (FERMENTALG) 08/10/2015. Resumen, reivindicaciones 1-13	1-19, 23, 24
X	MANIKAN V et al. A new strain of docosahexaenoic acid producing microalga from Malaysian coastal waters. Algal Research. Mayo 2015 Elsevier B.V. Netherlands Vol: 9, pags: 40 - 47 ISSN 2211-9264. Resumen	20-22
A	SULEEPORN KITCHA et al. Screening of Oleaginous Yeasts and Optimization for Lipid Production Using Crude Glycerol as a Carbon Source. Energy Procedia Elsevier. 2011. Vol: 9, páginas: 274 – 282. ISSN 1876-6102. Resumen.	1-24
A	CN 103614427 A (UNIV FUJIAN) 05/03/2014, (resumen) WPI [base de datos en línea] [recuperado el 27-02-2017]. Recuperado de EPOQUE-WPI, nº de acceso. 2014-H04990.	1, 13.

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia  
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría  
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita  
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud  
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

<b>Fecha de realización del informe</b> 27.02.2017	<b>Examinador</b> J. Manso Tomico	<b>Página</b> 1/5
---	--------------------------------------	----------------------

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, C12P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.02.2017

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-19, 21-24	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 20	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-24	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2015150716 A2 (FERMENTALG)	08.10.2015
D02	MANIKAN V et al. A new strain of docosahexaenoic acid producing microalga from Malaysian coastal waters. Algal Research May 2015 Elsevier B.V. Netherlands 00/05/2015 VOL: 9 Paginas: 40 - 47 ISSN 2211-9264. Resumen	30.04.2015
D03	SULEEPORN KITCHA et al. Screening of Oleaginous Yeasts and Optimization for Lipid Production Using Crude Glycerol as a Carbon Source. Energy Procedia Elsevier, NL // VOL: 9 Paginas: 274 - 282 ISSN 1876-6102.resumen.	
D04	CN 103614427 A (UNIV FUJIAN)	05.03.2014

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

Las reivindicaciones 1-19, 23, 24 de la presente solicitud cumplirían con el requisito de novedad tal y como se menciona en el art. 6 de la ley 11/1986, puesto que ninguno de los documentos del estado de la técnica divulga un cultivo para la producción de DHA, y un procedimiento para la producción de DHA que contenga las mismas características técnicas del que aparecen en tales reivindicaciones.

La reivindicación 20 no cumpliría con el requisito de novedad puesto que D02 divulga un producto conteniendo un alga de la clase *Labetintullidos* y un colorante, en concreto Sudan Black. Se hace notar que las reivindicaciones que definen un producto obtenible por un procedimiento, es decir las denominadas de producto por proceso, carecen de novedad si en el estado de la técnica se encuentra un producto esencialmente idéntico al reivindicado, aun cuando el procedimiento para su obtención sea distinto.

El documento D01, que se considera el documento del estado de la técnica más cercano al objeto de la invención que aparece en las reivindicaciones 1, 13, y dependientes, se refiere a un método para cultivar un protista del género *Aurantiochytrium mangrovei*. Con este método se consigue un alto rendimiento de biomasa y de lípidos, en concreto ácido docosahexaenoico (DHA), con el consiguiente enriquecimiento de los protistas así cultivados. El medio de cultivo contiene glucosa 20-60 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2-9 g/L y tiamina 1-50 mg/L, y una baja cantidad de iones Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>.

D02 divulga un protista pertenecientes a la clase *Labyrinthula*. Este grupo de microbios se considera una fuente alternativa aceites omega-3 de alto valor, especialmente ácido docosahexaenoico (DHA). Cuando se cultivó en un medio compuesto de glucosa, sal marina, glutamato monosódico, y extracto de levadura produjo una cantidad de biomasa de 13,17 g / L y 3,6 g / L de DHA. La visualización del desarrollo de gotitas lipídicas en SW1 usando el colorante negro Sudan B reveló que las gotitas de lípido se agrandan para ocupar casi todo el volumen celular dentro de las 72 a 96 horas de cultivo. También se encontró que esta cepa era capaz de utilizar diversos sacáridos como fuente de carbono.

D03 se refiere a un método de producción de lípidos mediante el uso de levaduras oleaginosas usando nitrógeno inorgánico en lugar de extracto de levadura en orden a reducir los costes de producción. En organismo productores de aceites, tales como *Kodamaea ohmeri* y *Trichosporonoides saphthulata*, se utilizó el sulfato amónico como fuente apropiada para incrementar la producción de biomasa y de lípidos (resumen; página 276, párrafo 3, página 278, párrafos 1-4).

D04 muestra un método para la producción de ácido docosahexaenoico (DHA) en cantidades de entre 10,3-15,4 g/l de DHA, haciendo uso de *Aurantiochytrium*. El medio de cultivo (100 ml) comprende 1-2 g de peptona, 1-2 g de extracto de levadura, 2-3 g de agua de mar, 0,04-0,06 g de fosfato monopotásico, 0,02-0,03 g de sulfato de amonio, 0,2-0,4 g de sulfato sódico y resto agua. Consta de cuatro etapas: la etapa (a) se realiza a una temperatura de 80-100 ° C durante 30-60 minutos. La etapa (b) se realiza a 50-55 ° C durante 6-7 días. El paso (c) se realiza añadiendo 10 - 12 ml de *Aurantiochytrium* y controlando la temperatura del medio de cultivo entre 27,5-28,5°C, fermentando continuamente a 85 - 95 horas y controlando la temperatura del cultivo a 24,5-25,5°C.

La diferencia entre el documento D01 y el objeto de las reivindicaciones 1-20 sería, en términos de porcentajes, las distintas cantidades de las fuentes de nitrógeno en relación con el extracto de levadura, y las fuentes de carbono. El efecto técnico producto de esta diferencia sería el incremento de la producción de DHA (un 53%, según aparece en la línea 3, página 3), y de la producción de biomasa (un 38%, según se menciona en la línea 3, página 3). El problema técnico planteado sería el desarrollo de un medio de cultivo que incremente la producción de biomasa enriquecida con DHA usando bacterias del grupo de *Aurantiochytrium*, más concretamente *Laberintúlidos*. La solución a este problema, tal y como aparece en las reivindicaciones 1, 13, 20 y dependientes sería la obtención de un medio de cultivo que contiene una proporción entre fuentes secundarias de nitrógeno y de extracto de levadura, en g/l, entre 0,007 y 0.6, y una concentración de fuente de carbono, en g/l, ente 0.005 y 0.4.

La solución al problema planteado, tal y como aparece propuesto en la reivindicación 1 de la presente solicitud, no divulga de manera clara las concentraciones específicas que permiten alcanzar los incrementos, tanto en biomasa como en DHA, que se mencionan en la descripción. En la tabla 1 ( página 13 de la descripción) no se establece con la necesaria claridad cuáles fueron las concentraciones concretas de los compuestos utilizados como fuente de carbono y de nitrógeno que permitan definir los rangos reivindicados en la reivindicación 1, y ser comparadas con las cantidades utilizadas en los documentos del estado de la técnica. Tampoco se aportan datos concretos sobre las cantidades, en g/l, tanto de biomasa como de DHA que se obtuvieron con el medio de cultivo y el procedimiento objeto de la invención, de forma que permitan comparar con los documentos del estado de la técnica si los incrementos alcanzados son mayores que los alcanzados por otros métodos alternativos a los que se refieren los distintos documentos que conforman el estado de la técnica.

Así pues, son esenciales para la definición de la invención que aparezcan de manera clara las cantidades de las fuentes de carbono y nitrógeno utilizadas, así como las de extracto de levadura, que permitan establecer sin ambigüedad los rangos y proporciones tal y como se reivindican. También sería esencial conocer las cantidades obtenidas de biomasa y de DHA para poder compararlos con los del estado de la técnica, con el fin de evaluar los porcentajes de incremento como efecto técnico alcanzado.

Las reivindicaciones 21, 22, tampoco cumplirían con el requisito de actividad inventiva puesto que la clase y concentración del pigmento no parece traer consigo efecto técnico alguno.

Por tanto, ese considera que el objeto de las reivindicaciones 1-24 no cumplirían con el requisito de actividad inventiva tal y como se menciona en el art. 8 de la ley 11/1986.