

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 650 440**

51 Int. Cl.:

C12N 1/12 (2006.01)

C12N 13/00 (2006.01)

C12P 7/64 (2006.01)

C12P 23/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2013 PCT/FR2013/050547**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.09.2013 WO13136028**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2013 E 13715330 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 2825631**

54 Título: **Producción de ácido docosahexaenoico y de astaxantina en modo mixótrofo por Schizochytrium**

30 Prioridad:

16.03.2012 FR 1252380

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

18.01.2018

73 Titular/es:

**FERMENTALG (100.0%)
4 rue Rivière
33500 Libourne, FR**

72 Inventor/es:

**ROMARI, KHADIDJA;
LE MONNIER, ADELINÉ;
ROLS, CYRIL;
MERLET, CINDY;
PAGLIARDINI, JULIEN;
CALLEJA, PIERRE y
GUDIN, CLAUDE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 650 440 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

Producción de ácido docosahexaenoico y de astaxantina en modo mixótrofo por *Schizochytrium*

- 5 La invención se refiere a un procedimiento de cultivo en modo mixótrofo, principalmente en presencia de una iluminación discontinua y/o variable de luz, de un protista de la clase *Labyrinthulomycete*, en particular del género *Schizochytrium*. El procedimiento permite obtener un alto rendimiento en biomasa y un enriquecimiento de los protistas así cultivados en lípidos y en carotenoides y más particularmente en ácido docosahexaenoico (DHA) y en astaxantina. El procedimiento permite seleccionar así las cepas de *Schizochytrium* con carácter mixótrofo, y que tienen un alto rendimiento en lípidos y/o carotenoides, y más particularmente en ácidos grasos poliinsaturados y en astaxantina. La invención se refiere también a una nueva cepa de protista que pertenece al género *Schizochytrium*, particularmente adaptada a la producción de lípidos y de carotenoides. Esta nueva cepa de *Schizochytrium* es útil para producir ácido docosahexaenoico (DHA) y astaxantina en modo mixótrofo.

Preámbulo

- 15 Los protistas son microorganismos con organización celular simple, es decir, son generalmente unicelulares y a veces multicelulares, pero sin presentar tejidos especializados. Pueden ser autótrofos o heterótrofos.
- 20 Los protistas son actualmente el objeto de numerosos proyectos industriales ya que determinadas especies son capaces de acumular o de secretar cantidades importantes de lípidos, principalmente de ácidos grasos poliinsaturados.
- Schizochytrium* es un protista de la familia de los *Thraustochytriaceae*, un grupo muy extendido de hongos marinos. Los *Thraustochytrides* son conocidos por producir una gran gama de lípidos, en particular de ácidos grasos poliinsaturados, y algunas especies son conocidas por producir carotenoides (CHATDUMRONG W ET AL, "Optimization of docosahexaenoic acid (DHA) production and improvement of astaxanthin content in a mutant *Schizochytrium limacinum* isolated from mangrove forest in Thailand", vol. 41, (2007), páginas 324-334, KASETSART JOURNAL; TSUNEHIRO AKI ET AL, "Thraustochytrid as a potential source of carotenoids", JOURNAL OF THE AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY, (20030801), vol. 80, no. 8, páginas 789-794).
- 25 Entre los ácidos grasos poliinsaturados, determinados ácidos grasos altamente insaturados (AGHI) de la serie de los omega-3 (PUFA- ω 3), en particular el ácido eicosapentaenoico (EPA o C20:5 ω 3) y el ácido docosahexaenoico (DHA o C22:6 ω 3), y de la serie de los omega-6 (PUFA- ω 6), en particular, el ácido araquidónico (ARA o AA o también el ácido eicosatetraenoico C20:4 ω 6) tienen una importancia nutricional reconocida y presentan fuertes potencialidades en términos de aplicaciones terapéuticas.
- 30 Considerado como un nutriente esencial, el DHA es necesario para el desarrollo normal y funcional de las células, y juega un papel crucial en diversos procesos y funciones bioquímicas. Su naturaleza poliinsaturada le confiere una importancia crucial frente a las propiedades de la membrana celular, tanto en las plantas como en los animales: fluidez, flexibilidad y permeabilidad selectiva que les permite, por ejemplo, una adaptación efectiva, e incluso la supervivencia, a bajas temperaturas, en particular, en los peces.
- 35 El DHA es un constituyente estructural principal del cerebro humano y es el ácido graso principal en éste. El DHA representa el 15-20% de la corteza cerebral (el cerebro de un adulto contiene al menos 20 g de DHA) y el 30-60% de la retina. Es indispensable para el desarrollo del sistema nervioso central y para la función retiniana, mediante la incorporación en las membranas celulares, y juega un papel capital en la adquisición y el mantenimiento satisfactorio de los mecanismos de la visión y de la memoria.
- 40 Los aceites de pescado, resultantes de la industria pesquera, son actualmente la fuente comercial principal de este tipo de ácidos grasos. Sin embargo, aunque estos aceites encuentran nuevas aplicaciones (complemento alimenticio en acuicultura, integración en las margarinas), los recursos pesqueros marinos se enrarecen debido a una actividad de pesca intensiva.
- 45 Por lo tanto, deben buscarse nuevas fuentes de estos ácidos grasos tales como EPA, DHA y ARA con el fin de responder, en el futuro, a la demanda creciente del mercado para este tipo de ácidos grasos poliinsaturados.
- Además de su capacidad de sintetizar los ácidos grasos *de novo*, los protistas ofrecen varias ventajas respecto a los aceites de pescado: son cultivables *in vitro* en condiciones controladas, lo que permite la producción de una biomasa de composición bioquímica relativamente constante y, por otra parte, contrariamente a los aceites de pescado, no presentan un olor desagradable y sus lípidos no contienen o contienen poco colesterol.
- 50 Finalmente, los lípidos producidos por los protistas tienen un perfil de ácidos grasos más simple que el de los aceites de pescado, lo que limita las etapas de separación de los ácidos grasos de interés.
- Por otra parte, los carotenoides son igualmente moléculas de interés. Se utilizan generalmente como pigmentos, pero tienen también un papel importante para la sanidad humana como agentes antioxidantes. Finalmente, presentan la capacidad de estimular el sistema inmunitario.

- 5 Para llevar a cabo la producción de los ácidos grasos y de carotenoides por los protistas a escala industrial, deben tenerse en cuenta varios factores. Por ejemplo, los cultivos pueden realizarse en condición autótrofa, mixótrofa o heterótrofa según la cepa, la temperatura, las condiciones de luz y el tamaño de los fermentadores. Por ejemplo, los cultivos pueden realizarse igualmente en contenedores de un litro, en un laboratorio, en fotobiorreactores, y en contenedores de 100.000 litros o bien en estanques abiertos (varias hectáreas). Sin embargo, las reservas energéticas y otros recursos tales como la mano de obra y la facilidad de seguimiento del cultivo deben tenerse en cuenta en el desarrollo de las condiciones de cultivo ideales. Los biorreactores se describen principalmente en WO 2009/134111 o WO 96/21723.
- 10 En cualquier caso, es deseable que los protistas se cultiven en las condiciones óptimas para aumentar el rendimiento del o de los ácidos grasos y del o de los carotenoides que se quieren producir. Así, es preferible tener un rendimiento lo más elevado posible (por ejemplo, una biomasa más allá de 80 g/l de materia seca, más de 25% de ácidos grasos en peso respecto al peso total de la materia seca, y por ejemplo más de 0,2% en peso de carotenoides sobre el peso total de materia seca).
- 15 El efecto de la luz en el crecimiento no está reservado únicamente a los organismos fotosintéticos (plantas; cianobacterias, microalgas y macroalgas). Determinados organismos no clorofílicos poseen fotorreceptores que les permiten captar las señales luminosas esenciales para su desarrollo. Los fotorreceptores como el fitocromo representan un ejemplo típico de un captador de luz que controla el desarrollo del organismo que lo posee. Hasta la fecha, se han descrito diferentes fotorreceptores, a saber, entre otros, los pigmentos auxiliares, los criptocromos y las fototropinas.
- 20 *Schizochytrium* se conoce por producir DHA en modo heterótrofo, así como astaxantina, cuando se cultiva en heterotrofia, en presencia de una luz fluorescente continua [R. Poontawe, *et al.* (2008); Optimization of DHA and astaxanthin production by *Schizochytrium* sp. isolated from mangrove forests in Thailand. JSPS-NRCT core university program on development of thermotolerant microbial resources and their applications, p. 134-135].
- 25 Sin embargo, desde la perspectiva de una explotación industrial, dicho modo de cultivo se demuestra inadecuado. En efecto, para ser rentable, la producción de biomasa debe poder realizarse en fotobiorreactores cerrados de gran dimensión. No obstante, dicho modo de cultivo es difícil de realizar, ya que cuando la densidad de las células aumenta en el medio de cultivo, las células tienen cada vez más dificultad para captar la luz que proviene del exterior del reactor. Es necesario remover activamente el medio de cultivo, para lo que se necesita un gasto energético importante.
- 30 Sería deseable poder obtener rendimientos en DHA y astaxantina más importantes de lo que está descrito en la técnica anterior para una explotación industrial más eficaz y rentable.
- Para mejorar el rendimiento en DHA y en astaxantina, una alternativa al cultivo en modo de cultivo descrito anteriormente sería practicar los cultivos en modo mixótrofo, es decir, con un aporte de luz de menor intensidad y en presencia de un aporte de sustrato orgánico.
- 35 Se entiende que el término mixótrofo se emplea habitualmente respecto a cepas que presentan un cloroplasto, capaces de desarrollarse en presencia de luz utilizando dos fuentes de carbono (orgánico e inorgánico). En el caso de las cepas del género *Schizochytrium*, dicho cloroplasto no se ha identificado. Sin embargo, siendo la cepa a la vez heterótrofa y reactiva a la luz, el término mixótrofo se ampliará en el sentido de la invención a esta categoría de cepa.
- 40 Así, como resultado de numerosos experimentos en condiciones de luz inhabituales y por la adición de diferentes sustratos, el solicitante ha conseguido aislar cepas de protista de la especie *Schizochytrium*, cultivables en modo mixótrofo que permite, en las condiciones de la presente invención, una producción con alto rendimiento de ácidos grasos poliinsaturados y de carotenoides, principalmente de DHA y de astaxantina.
- 45 Una cepa (FCC 1104) representativa de las nuevas cepas de *Schizochytrium* así aisladas y seleccionadas, se ha depositado en la CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa, Scottish Association for Marine Science, Dunstaffnage Marine Laboratory, Oban, Argyll PA371QA, Escocia, Reino Unido) según las disposiciones del Tratado de Budapest, con el número de acceso CCAP 4087/1.
- 50 El procedimiento de cultivo y de selección ha consistido más particularmente en cultivar los protistas en condiciones de mixotrofia, en presencia de una iluminación variable y/o discontinua, principalmente en forma de flashes, con una gama de variaciones de intensidad luminosa y una frecuencia específica.
- 55 La alternancia próxima de fases de iluminación y de fases oscuras o de menor intensidad luminosa, percibido generalmente como estresante por los protistas, ha permitido, de forma sorprendente, obtener cepas de *Schizochytrium* con una producción elevada de biomasa, de lípidos y más particularmente de ácidos grasos poliinsaturados y de carotenoides. Este empleo de las cepas según la invención abre la perspectiva de una producción industrial de ácidos grasos poliinsaturados, en particular de DHA, y de carotenoides, en particular de astaxantina, en fermentadores que se benefician de un aporte luminoso reducido, y por lo tanto debería permitir realizar ahorros de energía respecto a los modos de cultivo descritos precedentemente.

Los diferentes aspectos y ventajas de la invención se detallan más adelante.

Descripción detallada

5 La presente invención tiene por lo tanto por objeto un procedimiento de cultivo de los protistas de la clase *Labyrinthulomycete*, principalmente de la familia *Thraustochytride*, en particular del género *Schizochytrium*, en modo mixótrofo en condiciones de iluminación discontinua y/o variable a lo largo del tiempo. La iluminación presenta variaciones de intensidad, entre las fases iluminadas y las fases oscuras, cuya amplitud está comprendida entre 30 $\mu\text{moles. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ y 1.000 $\mu\text{moles. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, preferentemente entre 30 y 400 $\mu\text{moles. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Estas variaciones tienen lugar entre 2 y 3.600 veces por hora, preferentemente entre 2 y 200 veces por hora. Estas condiciones de cultivo permiten aportar una cantidad definida de luz. Este aporte luminoso puede comportar fases de iluminación discontinua y/o variable, pudiendo tener las variaciones de intensidad amplitudes idénticas o diferentes. La iluminación puede ser principalmente en forma de flashes.

15 Este procedimiento tiene la ventaja de aumentar el rendimiento en biomasa obtenido del cultivo. Tiene también la ventaja de enriquecer los protistas así cultivados en ácidos grasos poliinsaturados, más particularmente en ácido docosahexaenoico (DHA), y en carotenoides, más particularmente en astaxantina. Este procedimiento puede utilizarse igualmente para seleccionar las cepas de la clase *Labyrinthulomycete*, principalmente de las familias *Thraustochytride* y *Labyrinthulide*, en particular del género *Schizochytrium*, con carácter mixótrofo, y que tienen un alto rendimiento en ácidos grasos poliinsaturados, principalmente en DHA, y en carotenoides, principalmente en astaxantina.

20 El cultivo en modo mixótrofo de este protista se efectúa preferentemente en presencia de 100 mM a 1,5 M, preferentemente de 300 mM a 1,2 M, más preferentemente de 500 mM a 1 M, e incluso más preferentemente de 600 mM a 900 mM de un sustrato carbonado orgánico. El aporte de sustrato se asegura continuamente durante el cultivo, con el fin de permitir a las células acumular una concentración importante de lípidos y de carotenoides. El sustrato adicional se añade al medio de cultivo durante el procedimiento de cultivo para mantener una concentración constante. Este sustrato carbonado orgánico comprende preferentemente, en forma pura o mezclado: glucosa, derivados de celulosa, sacarosa y/o glicerol.

25 El sustrato carbonado orgánico contenido en el medio de cultivo puede consistir en moléculas complejas o en una mezcla de sustratos. Los productos resultantes de la biotransformación del almidón, por ejemplo, a partir de maíz, de trigo o de patata, principalmente los hidrolizados de almidón, que están constituidos por moléculas de pequeño tamaño, constituyen, por ejemplo, sustratos carbonados orgánicos adaptados para el cultivo en mixotrofia de los protistas según la invención.

30 Este procedimiento está destinado más particularmente al empleo de nuevas cepas de la clase *Labyrinthulomycete*, en particular del género *Schizochytrium* (División: Myxomycota, Orden: Saprolegniales, Familia: Thraustochytriaceae) [ITIS Catalogue of Life, 2010] seleccionadas por su carácter mixótrofo, y que tienen un alto rendimiento en ácidos grasos poliinsaturados, principalmente en DHA, y en carotenoides, principalmente en astaxantina, y principalmente por su capacidad de ser cultivados con un aporte luminoso superior a 10 μE , en un medio rico en elementos orgánicos, por ejemplo el medio Verduyn modificado (sales marinas 15 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3g/L, KH_2PO_4 1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g/L, Na_2EDTA 24 mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 mg/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3 mg/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,04 mg/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10mg/L, pantotenato 3,2mg/L, Hidrocloruro de tiamina 9,5mg/L, Vitamina B12 0,15mg/L, Antiespumante 0,1 mL/L) al que se añade un sustrato carbonado orgánico. Preferentemente, el sustrato carbonado orgánico comprende glucosa, glicerol, en una concentración equivalente o superior a 300 mM.

Por « cepa », se entiende no solamente las cepas naturales del género *Schizochytrium*, sino igualmente los mutantes de dichas cepas naturales.

Estas nuevas cepas de *Schizochytrium* pueden aislarse y seleccionarse según el procedimiento de selección y de cultivo descrito más adelante.

45 Una cepa representativa de las cepas de *Schizochytrium* es la cepa FCC 1104 aislada por el solicitante y depositada en la CCAP con el número CCAP 4087/1. Dichas cepas son capaces de producir cantidades significativas de biomasa, así como de lípidos y de carotenoides, y más particularmente de DHA y de astaxantina cuando se cultivan en modo mixótrofo con un aporte de luz variable o discontinuo, según la invención.

Según los análisis taxonómicos en curso, la cepa CCAP 4087/1 pertenece al género *Schizochytrium*.

50 Les cepas de *Schizochytrium* aisladas permiten producir, en condición de mixotrofia, cantidades significativas de biomasa, así como de lípidos y de carotenoides, estando los lípidos enriquecidos en DHA. Dicho DHA puede representar más del 40%, o más del 50%, o más del 60% de los lípidos totales contenidos en los protistas, estando los carotenoides enriquecidos en astaxantina, y dicha astaxantina puede representar más del 0,1%, o más del 0,15%, o más del 0,2% en peso sobre el peso total de materia seca. Las cepas pueden conseguir un nivel de productividad (cantidad de producto de interés producido, por litro de cultivo, por hora) de 0,015 mg/L/h, o más de 0,020mg/L/h, o más de 0,025 mg/L/h.

En la presente invención, las cepas de *Schizochytrium* (por ejemplo, la cepa FCC 1104, aislada por el solicitante) que se cultivan en condiciones mixótrofas en presencia de una iluminación variable y/o discontinua, principalmente en forma de flashes, permiten producir astaxantina. Por el contrario, en condiciones de heterotrofia, no es detectable nada de astaxantina. Además, las cantidades de biomasa obtenidas en modo mixótrofo según determinados modos de realización de la invención son iguales o incluso superiores (por ejemplo, aproximadamente 10-18%) a las cantidades obtenidas en condiciones de heterotrofia. Por, condiciones de heterotrofia se entiende las condiciones de cultivo con un medio de cultivo idéntico, pero en ausencia de luz.

La invención tiene así por objeto un procedimiento de cultivo de cepas de protistas de *Schizochytrium*, principalmente de la especie *Schizochytrium* sp. tal como depositada, en modo mixótrofo, en presencia de una iluminación variable o discontinua a lo largo del tiempo, por ejemplo, en forma de flashes, principalmente con el objetivo de producir ácidos grasos poliinsaturados y carotenoides, tales como DHA y astaxantina.

Se reveló que una iluminación variable y/o discontinua de los cultivos, en particular en el empleo de un cultivo en modo mixótrofo, tenía un impacto favorable sobre el desarrollo de los protistas y permitía incrementar la productividad de éstos, principalmente en lo que respecta a su producción de lípidos y de carotenoides. Sin estar ligado por teoría, el inventor estima que un aporte discontinuo y/o variable de luz a los protistas tiene como efecto provocar un « estrés » favorable para el crecimiento y la síntesis de lípidos, así como la síntesis de carotenoides. Este fenómeno podría explicarse, en parte, por el hecho de que, en la naturaleza, los protistas tienen la tendencia a acumular reservas lipídicas y de carotenoides para resistir las restricciones de su entorno.

Por iluminación discontinua, debe entenderse una iluminación acompañada de periodos de oscuridad. Los periodos de oscuridad pueden ocupar más de un cuarto del tiempo, preferentemente la mitad del tiempo o más, durante el que las algas se cultivan.

Según un aspecto preferido de la invención, la iluminación es discontinua y más preferentemente en forma de flashes. Un flash, en el sentido de la invención, es una iluminación luminosa de corta duración, es decir de menos de 30 minutos. La duración puede ser de menos de 15 minutos, preferentemente de menos de 5 minutos o más preferentemente también de menos de 1 minuto. Según determinados modos de realización de la invención, la duración del flash puede ser de menos de un segundo. Por ejemplo, la duración del flash puede ser de 1/10 de un segundo, o de 2/10 de un segundo, o de 3/10 de un segundo, o de 4/10 de un segundo o de 5/10 de un segundo, o de 6/10 de un segundo, o de 7/10 de un segundo, o de 8/10 de un segundo, o de 9/10 de un segundo. La iluminación luminosa, o el flash, tiene generalmente una duración superior a 15 segundos. Está comprendida generalmente entre 5 segundos y 10 minutos, preferentemente entre 10 segundos y 2 minutos, más preferentemente entre 20 segundos y 1 minuto.

En general, el número de flashes está comprendido entre aproximadamente 2 y 3.600 por hora. Puede estar comprendido, por ejemplo, entre 100 y 3.600 flashes por hora. Puede estar comprendido igualmente entre 120 y 3.000, o entre 400 y 2.500, o entre 600 y 2.000, o entre 800 y 1.500 flashes por hora. Puede estar comprendido igualmente entre 2 y 200, preferentemente entre 10 y 150, más preferentemente entre 15 y 100, y más preferentemente aún entre 20 y 50 por hora. Los flashes pueden emitirse a un intervalo regular o no en el tiempo. En caso de emisión a intervalo regular, el número de flashes por hora corresponde a una frecuencia (F) que tiene un periodo temporal (T), considerándose que $F = 1/T$. Este periodo temporal puede estar comprendido entre 1 segundo y 30 minutos, o entre 1 segundo y 36 segundos, o también entre 1,2 segundos y 30 segundos, o entre 1,44 segundos y 9 segundos, o entre 1,8 segundos y 6 segundos, o entre 2,4 segundos y 4,5 segundos. Esta frecuencia puede estar comprendida igualmente entre 18 segundos y 30 minutos, preferentemente entre 24 segundos y 6 minutos, más preferentemente entre 36 segundos y 4 minutos, y más preferentemente aún entre 72 segundos y 3 minutos. El número de flashes por hora se elige en función de la intensidad y de la duración de los flashes (véase más adelante). En general, la intensidad de la luz aportada en forma de flashes es entre 30 y 1.000 $\mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, preferentemente entre 30 y 500 $\mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, o 50 y 400 $\mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, y más preferentemente entre 150 y 300 $\mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ corresponde a 1 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (Einstein), unidad utilizada frecuentemente en la bibliografía.

Según un modo particular de la invención, la intensidad de la luz está comprendida entre 50 y 200 $\mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, el periodo temporal de la frecuencia de los flashes está comprendido entre 10 segundos y 60 minutos para una duración de flash comprendida entre 1 segundo y 1 minuto.

Según la invención, cualesquiera que sean las condiciones de iluminación, la intensidad luminosa aportada a las algas en cultivo, expresada en micromoles de fotones por segundo por metro al cuadrado ($\mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), varía al menos una vez en una misma hora. La amplitud de esta variación de intensidad de luz está comprendida generalmente entre 30 y 1.000, o entre 50 y 800, o entre 100 y 600 $\mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Preferentemente, la amplitud de la variación de la intensidad de la luz es entre 70 y 300 $\mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ y más preferentemente entre 100 y 200 $\mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Alternativamente, en condiciones de iluminación discontinua, dicha intensidad luminosa puede alcanzarse sucesivamente, varias veces en la hora, por ejemplo, los valores 0 y 50 $\mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, los valores 0 y 100 $\mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ o preferentemente también los valores 0 y 200 $\mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Puede alcanzar igualmente sucesivamente,

ES 2 650 440 T3

varias veces en la hora, por ejemplo, los valores 0 y 300 $\mu\text{moles. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, los valores 0 y 600 $\mu\text{moles. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, los valores 0 y 800 $\mu\text{moles. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ o también los valores 0 y 1.000 $\mu\text{moles. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

5 Según un modo de la invención y cualesquiera que sean las condiciones de iluminación, la intensidad de la luz aportada al cultivo varía en función de la densidad celular. Cuanto más denso se vuelva el cultivo, más intensa puede ser la luz. La densidad celular es el número de células por ml y se mide según técnicas conocidas para el experto en la técnica.

10 Cuando el cultivo alcanza una densidad entre 10^6 y 10^7 células por ml, la intensidad luminosa puede aumentarse hasta entre 30 y 500 $\mu\text{moles. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, por ejemplo, preferentemente, entre 50 y 400 $\mu\text{moles. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Cuando el cultivo, en el estadio final, alcanza una densidad entre 10^7 y 10^8 células por ml, la intensidad luminosa puede aumentarse hasta entre 100 y 1.000 $\mu\text{moles. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, por ejemplo, preferentemente, entre 200 y 500 $\mu\text{moles. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Según un modo de la invención, la cantidad de luz aportada al cultivo en la hora permanece entre determinados valores. Está comprendida entre aproximadamente 2.000 y 600.000, preferentemente entre 2.000 y 300.000 $\mu\text{moles. m}^{-2}$. Puede estar comprendida entre aproximadamente 4.000 y 200.000 $\mu\text{moles. m}^{-2}$, por hora.

15 Según otro modo de la invención, el cultivo se ilumina con 120 flashes por hora, teniendo cada flash una duración de 10 segundos y una intensidad de 200 $\mu\text{moles. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, lo que proporciona un aporte total de luz por hora de 240.000 $\mu\text{moles. m}^{-2}$.

20 Como se ha descrito para la intensidad luminosa anteriormente, y según un modo de la invención, la cantidad de luz aportada al cultivo por hora puede variar en función de la densidad celular. En el estadio inicial del cultivo cuando la densidad celular es 10^5 y 5×10^5 células por ml, el aporte total de luz en la hora está comprendido generalmente entre aproximadamente 1.500 y 8.000, preferentemente 1.500 y 6.000 $\mu\text{moles. m}^{-2}$, preferentemente también entre 2.000 y 5.000 $\mu\text{moles. m}^{-2}$. Cuando el cultivo alcanza una densidad entre 10^6 y 10^7 células por ml, el aporte total de luz en la hora puede aumentarse hasta entre 6.000 y 67.000 $\mu\text{moles. m}^{-2}$, preferentemente, entre 6.000 y 50.000 y preferentemente también entre 12.000 y 45.000 $\mu\text{moles. m}^{-2}$, por ejemplo. En el estadio final del cultivo, a una densidad celular entre 10^7 y 10^8 células por ml, el aporte total de luz en la hora puede aumentarse hasta entre 45.000 y 300.000, por ejemplo, preferentemente entre 45.000 y 200.000 $\mu\text{moles. m}^{-2}$, y, por ejemplo, preferentemente también, entre 50.000 y 150.000 $\mu\text{moles. m}^{-2}$.

30 Según un modo de la invención, por ejemplo, cuando la duración de los flashes es por ejemplo de menos de un minuto, o de menos de un segundo, en el estadio inicial del cultivo (a una densidad celular entre 10^5 y 5×10^5 células por ml), el cultivo se ilumina con 30 flashes por hora, teniendo cada flash una duración de 10 segundos y una intensidad entre 50 y 100 $\mu\text{moles. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, lo que proporciona un aporte total de luz por hora de 15.000 $\mu\text{moles. m}^{-2}$ a 30.000 $\mu\text{moles. m}^{-2}$. Después, en el estado intermedio (a una densidad celular entre 10^6 y 10^7 células por ml), el cultivo se ilumina con 50 flashes por hora, teniendo cada flash una duración de 10 segundos y una intensidad entre 200 y 300 $\mu\text{moles. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, lo que proporciona un aporte total de luz por hora de 100.000 a 150.000 $\mu\text{moles. m}^{-2}$. Después, en el estado final del cultivo (a una densidad celular entre 10^7 y 10^8 células por ml), el cultivo se ilumina con 120 flashes por hora, teniendo cada flash una duración de 10 segundos y una intensidad entre 350 y 450 $\mu\text{moles. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, lo que proporciona un aporte total de luz por hora de 420.000 a 540.000 $\mu\text{moles. m}^{-2}$.

40 El aporte de luz en los cultivos puede obtenerse por lámparas repartidas alrededor de la pared externa de los fermentadores. Un reloj acciona estas lámparas para los tiempos de iluminación definidos. Los fermentadores se sitúan preferentemente en un recinto al abrigo de la luz del día, en el que se pueda controlar la temperatura ambiente.

Tal y como ha podido constatar el depositante, el hecho de que las cepas así seleccionadas presenten buenas aptitudes de crecimiento en modo mixótrofo, en presencia de una luz discontinua y/o variable, predispone a dichas cepas a una producción más elevada de ácidos grasos poliinsaturados y de carotenoides, principalmente DHA y astaxantina.

45 El procedimiento de cultivo según la invención permite así seleccionar las cepas de la clase *Labyrinthulomycete*, principalmente de las familias *Thraustochytride*, en particular del género *Schizochytrium*, con carácter mixótrofo, similar a la aislada por el solicitante y depositada en la CCAP con el número CCAP 4087/1, y que tienen un alto rendimiento en ácidos grasos poliinsaturados y en carotenoides. Este procedimiento de cultivo se caracteriza porque comprende las etapas siguientes:

50 a) el cultivo en modo mixótrofo de una o varias cepas de la clase *Labyrinthulomycete*, en particular, del género *Schizochytrium* en condiciones de iluminación discontinua y/o variable a lo largo del tiempo, presentando la iluminación variaciones de intensidad cuya amplitud está comprendida entre 30 $\mu\text{moles. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ y 1.000, preferentemente entre 30 y 400 $\mu\text{moles. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, teniendo lugar estas variaciones entre 2 y 3.600, preferentemente 5-400 veces por hora,

55 b) una etapa de mantenimiento de dicho cultivo durante varias generaciones, en presencia de un sustrato carbonado orgánico en el medio de cultivo, y eventualmente

c) una etapa de recuperación de los protistas así cultivados.

Por etapa de recuperación, se entiende más particularmente el aislamiento de la o de las cepas para las que más se ha incrementado el número de células a lo largo de dichas generaciones.

5 Para realizar la selección de las cepas, diferentes cepas de la clase *Labyrinthulomycete*, principalmente la familia *Thraustochytride*, en particular, del género *Schizochytrium*, pueden cultivarse, en paralelo, en microplacas en un mismo recinto, con un seguimiento preciso de las condiciones y de la evolución de los diferentes cultivos. Es así fácil de conocer la respuesta de las diferentes cepas a la iluminación discontinua y/o variable y, llegado el caso, a la adición de uno o varios sustratos carbonados orgánicos en el medio de cultivo. Las cepas que responden favorablemente a la iluminación discontinua y/o variable y a los sustratos carbonados orgánicos ofrecen
10 generalmente un mejor rendimiento para la producción de carotenoides y de lípidos en el plano cualitativo (ácidos grasos poliinsaturados más abundantes en el perfil lipídico y astaxantina más abundante entre los carotenoides) y cuantitativo (los lípidos contienen una proporción más elevada de DHA y la materia seca contiene una proporción más elevada de astaxantina).

15 Los protistas pueden seleccionarse en un fermentador a partir de una población heterogénea y en la cual se busca seleccionar las variantes aventajadas por el modo de selección según la invención, ligando luz discontinua y/o variable, que presenta una gama de intensidad luminosa y una frecuencia específicas, con condiciones de cultivo mixótrofas. En este caso, el cultivo se realiza manteniendo a los protistas en cultivos durante numerosas generaciones, después se efectúa un aislamiento de los componentes que se han convertido en mayoritarios en el medio de cultivo al final del cultivo.

20 El procedimiento de cultivo según la invención permite igualmente producir lípidos y carotenoides.

En este caso, el procedimiento según la invención comporta además las etapas siguientes:

d) una etapa de recuperación de la materia hidrófoba de los protistas, y eventualmente

e) la extracción de DHA (ácido docosahexaenoico) y de astaxantina de la materia hidrófoba recuperada.

La materia hidrófoba comporta en efecto los lípidos y los carotenoides.

25 El procedimiento de cultivo según la invención puede aplicarse igualmente a cualquier especie del género *Schizochytrium*, capaz de crecer en condiciones mixótrofas según la invención, y capaz de producir DHA y astaxantina.

30 El procedimiento de cultivo según la invención permite optimizar la producción de la biomasa obtenida del cultivo. Igualmente, permite enriquecer a los protistas así cultivados en ácidos grasos poliinsaturados y en carotenoides, más particularmente en ácido docosahexaenoico (DHA) y en astaxantina.

35 La invención tiene por lo tanto igualmente por objeto la optimización de la producción de biomasa, así como la producción de lípidos y de carotenoides, principalmente de ácidos grasos, a través del cultivo de protistas del género *Schizochytrium* con carácter mixótrofo, preferentemente cultivados o seleccionados según los procedimientos considerados precedentemente, después la recuperación de los protistas así cultivados para extraer el contenido hidrófobo, en particular los lípidos como el DHA, y los carotenoides, como la astaxantina.

Los métodos de extracción selectiva de lípidos, como el DHA, son conocidos para el experto en la técnica y se describen, por ejemplo, por [Bligh, E.G. et Dyer, W.J. (1959); A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37:911-917].

40 Los métodos de extracción y de análisis de los carotenoides, como la luteína, son conocidos para el experto en la técnica y se describen, por ejemplo, por Wright et al. (1991) (S.W. Wright, S.W. Jeffrey, R.F.C. Mantoura, C.A. Llewellyn, T. Bjornland, D. Repeta, N. Welschmeyer: Improved HPLC method for the analysis of chlorophyll and carotenoids from marine phytoplankton. *Marine ecology progress series*: Vol. 77: 183-196, 1991).

Ejemplo 1

45 Los cultivos de *Schizochytrium* se realizan en fermentadores (biorreactores) de 1 a 2L útiles con autómatas especializados y supervisión por estación informática. El sistema se regula en pH mediante la adición de base (disolución de hidróxido de sodio 2N) y/o de ácido (disolución de ácido sulfúrico 1 N). La temperatura del cultivo se fija a 26°C. La agitación se realiza gracias a 3 elementos móviles de agitación situados sobre el árbol según la configuración de Rushton (hélices de tres palas con bombeo descendente). La presión de oxígeno disuelto se regula en el medio a lo largo de todo el cultivo, por la velocidad de agitación (250-600 rpm), el caudal de aire (0,25- 1 vvm),
50 es decir, el caudal de oxígeno (0,1-0,5 vvm). Los parámetros de regulación, integrados en el autómata de supervisión, permiten mantener una pO₂ constante al 15%. El biorreactor está equipado con un sistema de iluminación externo que rodea el tanque transparente. La intensidad, así como los ciclos de luz se controlan por un autómata especializado y se supervisan por la estación informática.

ES 2 650 440 T3

5 Los reactores se inoculan con un pre-cultivo realizado sobre una mesa de agitación (140 rpm) en un recinto termostatzado (26°C) e iluminado entre 100 y 200 μ E. Los pre-cultivos y los cultivos en los biorreactores se realizan en el medio Verduyn modificado (sales marinas 15 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3g/L , KH_2PO_4 1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g/L, Na_2EDTA 24 mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 mg/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3 mg/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,04 mg/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10mg/L, pantotenato 3,2 mg/L, Hidrocloruro de tiamina 9,5mg/L, Vitamina B12 0,15mg/L). El sustrato carbonado utilizado para el cultivo en mixotrofia clásica, en heterotrofia y en mixotrofia flash (luz variable/discontinua) en el biorreactor es glucosa a concentraciones entre 300 mM y 1 M.

Seguimiento de los cultivos:

10 La concentración en biomasa total se sigue por la medida de la masa seca (filtración sobre filtro GF/F, Whatman, y secado en estufa, 105°C, durante 24h mínimo antes de pesarla).

Respecto a la cuantificación de los lípidos totales, se extrajeron 10^8 células/mL. Los métodos de extracción de los lípidos son conocidos para el experto en la técnica.

Para la cuantificación de los carotenoides y principalmente astaxantina, se extrajeron 10^8 células/mL. Los métodos de extracción y de análisis de los carotenoides, como la astaxantina, son conocidos para el experto en la técnica.

15 Iluminación (para el cultivo en mixotrofia):

El cultivo se ilumina con 30 flashes por hora, teniendo cada flash una duración de 30 segundos y una intensidad de $80 \mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

20 El aporte de luz en los cultivos en biorreactor se obtuvo por lámparas LED (Diodos Electro Luminiscentes) repartidas alrededor de la pared externa del fermentador. Un reloj acciona estas LED para los tiempos de iluminación o pulsos (para el cultivo en mixotrofia flash con luz discontinua).

Resultados (n=3):

	Masa Seca (g/L)	Lípidos totales (% de la MS)	% DHA	Astaxantina (mg/g de MS)
Mixotrofia flash	140 +/- 2,1	28 +/- 0,6	43 +/- 1,8	2 +/- 0,1
Heterotrofia	118,1 +/- 2,5	28,8 +/- 0,6	45,2 +/- 2	0

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento que comprende la etapa siguiente:
 - 5 a) el cultivo en modo mixótrofo de una o varias cepas del género *Schizochytrium* en condiciones de iluminación discontinua y/o variable a lo largo del tiempo, presentando la iluminación variaciones de intensidad, entre las fases de iluminación y las fases oscuras, cuya amplitud está comprendida entre 30 $\mu\text{moles. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ y 1.000 $\mu\text{moles. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, teniendo lugar estas variaciones entre 2 y 3.600 veces por hora.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la iluminación presenta variaciones de intensidad cuya amplitud está comprendida entre 30 $\mu\text{moles. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ y 400 $\mu\text{moles. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, teniendo lugar estas variaciones entre 2 y 200 veces por hora.
- 10 3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque el cultivo se efectúa en presencia de un sustrato carbonado orgánico a una concentración de 100 mM a 1,5 M, preferentemente de 300 mM a 1,2 M, más preferentemente de 500 mM a 1 M, y aún más preferentemente de 600 mM a 900 mM, eligiéndose el sustrato carbonado orgánico entre sacarosa, glicerol, glucosa y los derivados de celulosa y una mezcla de estas moléculas.
- 15 4. Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque dicho sustrato carbonado orgánico presente en el medio de cultivo comprende al menos 300 mM de glucosa y/o glicerol.
5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, caracterizado porque la amplitud de las variaciones de intensidad está comprendida entre 30 y 1.000 $\mu\text{moles. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, preferentemente entre 70 y 300 $\mu\text{moles. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, y más preferentemente entre 100 y 200 $\mu\text{moles. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.
- 20 6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el aporte de luz se efectúa en forma de flashes.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque un flash tiene una duración comprendida entre 1/10 segundo y 10 minutos, preferentemente 5 segundos y 10 minutos, preferentemente también entre 10 segundos y 2 minutos, más preferentemente entre 20 segundos y 1 minuto.
- 25 8. Procedimiento según la reivindicación 6 o la reivindicación 7, caracterizado porque el número de flashes es entre 5 y 3.600, preferentemente entre 10 y 150, preferentemente entre 15 y 100, y más preferentemente entre 20 y 50 veces por hora.
9. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque el aporte total de luz por hora en micromoles de fotones es entre 2.000 a 600.000, preferentemente entre 2.000 a 200.000 $\mu\text{moles. m}^{-2}$.
- 30 10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque comprende además las etapas siguientes:
 - b) una etapa de mantenimiento de dicho cultivo durante varias generaciones en presencia de un sustrato carbonado orgánico en el medio de cultivo, y eventualmente
 - c) una etapa de recuperación de los protistas así cultivados, y eventualmente
 - d) una etapa de recuperación de la materia hidrófoba, y eventualmente
 - 35 e) la extracción de DHA (ácido docosahexaenoico) y de astaxantina de la materia hidrófoba recuperada.
11. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque dicho protista del género *Schizochytrium* corresponde a la cepa FCC 1104, depositada en la CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa), con el número CCAP 4087/1.