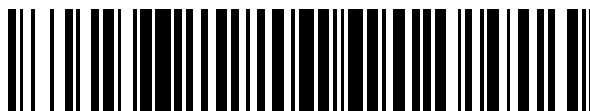


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 718 771**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/64** (2006.01)

**C12P 13/06** (2006.01)

**C12P 13/14** (2006.01)

**C12N 1/12** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.01.2016 PCT/FR2016/050159**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.08.2016 WO16120558**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.01.2016 E 16705239 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2018 EP 3250699**

54 Título: **Procedimiento de enriquecimiento de la biomasa de microalgas del género *Traustochytrium* en DHA y en aminoácidos Arg y Glu**

30 Prioridad:

**27.01.2015 FR 1550598**

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

**04.07.2019**

73 Titular/es:

**ROQUETTE FRÈRES (100.0%)  
1 rue de la Haute Loge  
62136 Lestrem, FR**

72 Inventor/es:

**CAULIER, BERNARD**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 718 771 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**

Procedimiento de enriquecimiento de la biomasa de microalgas del género *Traustochytrium* en DHA y en aminoácidos Arg y Glu

5 La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento fermentativo de enriquecimiento de la biomasa de microalgas del género *Traustochytrium*, más particularmente *Schizochytrium sp* o *Schizochytrium mangrovei*, en ácido docosahexanoico (o DHA) y en aminoácidos arginina y ácido glutámico, así como a un procedimiento de producción del aceite extraído de esta biomasa de microalgas.

Campo técnico de los lípidos

Los lípidos constituyen una de las tres grandes familias de macronutrimientos con las proteínas y los glucidos.

10 Entre los lípidos, se distinguen en particular los triglicéridos y los fosfolípidos:

- los triglicéridos (también denominados triacilgliceroles o triacilglicéridos o TAG) son unos glicéridos en los que los tres grupos hidroxilos del glicerol se esterifican por unos ácidos grasos. Son el constituyente principal del aceite vegetal y de las grasas animales.

15 Los triglicéridos representan aproximadamente el 95% de los lípidos alimenticios ingeridos por el hombre. En el organismo, están presentes principalmente en los tejidos adiposos y constituyen la forma principal de almacenamiento de la energía.

- los fosfolípidos son unos lípidos anfífilos, es decir constituidos de una “cabeza” polar (hidrófila) y de dos “colas” alifáticas (hidrófobos).

20 Los fosfolípidos son unos lípidos de estructura, ya que son unos constituyentes de las membranas celulares de las cuales aseguran entre otro la fluidez.

Triglicéridos y fosfolípidos están compuestos mayoritariamente de ácidos grasos que son al mismo tiempo aportados por la alimentación y, para algunos de ellos, sintetizados por el organismo.

25 La clasificación bioquímica (basada en el número de dobles enlaces contenidos en la molécula de ácido graso) distingue los ácidos grasos saturados (AGS), los ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) y los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI).

Desde el punto de vista fisiológico, se distinguen:

- los ácidos grasos indispensables necesarios para el desarrollo y al buen funcionamiento del cuerpo humano, pero que nuestro cuerpo no sabe fabricar;

30 - los ácidos grasos denominados “condicionalmente” indispensables, esenciales para el crecimiento normal y las funciones fisiológicas de las células, pero que pueden fabricarse a partir de su precursor si se aporta por la alimentación. Por lo tanto, se requieren rigurosamente si su precursor indispensable está ausente.

- los ácidos grasos no indispensables.

El conjunto de los ácidos grasos indispensables y “condicionalmente” indispensables constituyen los ácidos grasos esenciales.

35 Los otros ácidos grasos se denominan no esenciales.

Entre los ácidos grasos no indispensables, se encuentran en particular:

- el ácido eicosapentaenoico (EPA) de la familia de los ácidos grasos omega 3,

- el ácido oleico, el ácido graso monoinsaturado mayoritario en nuestra alimentación, y el ácido palmitoleico,

- los ácidos grasos saturados, tales como el ácido láurico, el ácido mirístico o el ácido palmítico.

40 Más particularmente, los ácidos grasos poliinsaturados se clasifican en función de la posición del primer doble enlace, a partir de la función metilo final.

Así, en la nomenclatura, para omega “x” o “nx”, “x” corresponde a la posición de la primera insaturación.

45 Se distinguen dos grandes familias de ácidos grasos esenciales: los ácidos grasos omega 6 (o AGPI n-6), cuyo precursor y representante principal es el ácido linoleico (LA) y los ácidos grasos omega 3 (o AGPI n-3) cuyo precursor es el ácido alfa-linolénico (ALA).

La mayoría de los ácidos grasos poliinsaturados de interés biológico pertenece a la familia de los omega 6 (ácido araquidónico o ARA) u omega 3 (ácido eicosapentaenoico o EPA, ácido docosahexaenoico o DHA).

Además, en la nomenclatura, se define también el número de carbono que constituye la cadena; así el EPA se describe como C20:5 y el DHA como C22:6.

5 El "5" y "6" corresponden así al número de insaturaciones de la cadena carbonada presentadas por EPA y por DHA.

El DHA, de la familia de los ácidos grasos omega 3, es un ácido graso que el organismo sabe sintetizar a partir del ácido alfa-linolénico, o que se aporta por el consumo de pescados grasos (atún, salmón, arenque, etc.).

El DHA tiene un papel importante en la estructura de las membranas y en el desarrollo y el funcionamiento del cerebro y de la retina.

10 Los aceites de pescado se utilizan principalmente como fuente de ácidos grasos de tipo omega 3, tales como el DHA y el EPA, pero se encuentran también en los aceites de microalgas a partir de los cuales se extraen o bien en mezcla, o bien separadamente, como es el caso, por ejemplo, de los aceites procedentes de algunas cepas seleccionadas, tales como aquellas del género *Schizochytrium*, que contienen solamente trazas de EPA pero altos contenidos en DHA.

15 Campo técnico de los péptidos y aminoácidos

Los péptidos y aminoácidos se valorizan clásicamente como agentes funcionales o complementos alimentarios en numerosos campos.

En el ámbito de la aportación de aminoácidos de interés, puede ser ventajoso en efecto disponer de fuentes de péptidos ricos en arginina y en ácido glutámico.

20 La arginina es un aminoácido que presenta numerosas funciones en el reino animal.

La arginina puede degradarse y así servir de fuente de energía, de carbono y de nitrógeno a la célula que lo asimila.

En diversos animales, entre ellos los mamíferos, la arginina se descompone en ornitina y en urea. Esta última es una molécula nitrogenada que puede eliminarse (por excreción en las orinas) a fin de regular la cantidad de compuestos nitrogenados presente en las células de los organismos animales.

25 La arginina permite la síntesis del monóxido de nitrógeno (NO) por la NO sintetasa, que interviene así en la vasodilatación de las arterias, lo que reduce la rigidez de los vasos sanguíneos, aumenta el flujo sanguíneo y mejora así el funcionamiento de los vasos sanguíneos.

Los complementos alimentarios que contienen la arginina se recomiendan para promover la salud del corazón, la función vascular, para prevenir la "agregación de plaquetas" (riesgo de formación de coágulos sanguíneos) y para disminuir la presión arterial.

30 La implicación de la arginina en la cicatrización de las heridas está relacionada con su papel en la formación de prolina, otro aminoácido importante para la síntesis de colágeno.

La arginina es, finalmente, un componente frecuentemente utilizado, en particular por los deportistas, en las bebidas energéticas.

35 El ácido glutámico, por su parte, no es sólo uno de los bloques elementales utilizados para la síntesis de las proteínas, sino que es también el neurotransmisor excitador más extendido en el sistema nervioso central (encéfalo + médula espinal) y es un precursor de GABA en las neuronas GABAérgicas.

Bajo el código "E620", el glutamato se utiliza como elevador de sabor de los alimentos. Se adiciona a las preparaciones alimentarias para reforzar su sabor.

40 Además del glutamato, el *Codex Alimentarius* ha reconocido también como elevador de sabor sus sales de sodio (E621), de potasio (E622), calcio (E623), amonio (E624) y magnesio (E625).

El glutamato (o sus sales) está frecuentemente presente en las comidas preparadas (sopas, salsas, patatas fritas, platos cocinados). Se utiliza también habitualmente en cocina asiática.

45 Actualmente se utiliza frecuentemente en combinación con aromas en los aperitivos (sabor a beicon, sabor a queso). Esto permite elevar el sabor a beicon, queso, etc. Es raro encontrar un aperitivo que no lo contenga.

Se encuentra también en algunas cápsulas de medicamentos pero por sus funciones gustativas.

Finalmente, es el componente principal de los ayudantes de cocina (cubos de caldo, base de salsas, salsas, etc.).

Producción de lípidos, en particular de ácidos grasos, por las microalgas

El cultivo de las microalgas del género *Schizochytrium* se realiza clásicamente en fermentadores (condiciones heterotróficas: en la oscuridad, en presencia de una fuente carbonada).

5 Cabe señalar que la explotación rentable de estas microalgas necesita generalmente el control de las condiciones de fermentación.

Para llegar a este resultado, los primeros procedimientos de fermentación que permiten obtener altas densidades celulares (acrónimo inglés: HCD por *High-Cell-Density*) se trabajaron, por lo tanto, mucho, a fin de obtener unos rendimientos y unas productividades máximos en los lípidos.

10 El objetivo de estos cultivos HCD eran la obtención de la concentración más elevada posible de lípidos deseados en el intervalo de tiempo más corto.

Sin embargo, se puso de manifiesto rápidamente para los especialistas del campo que se necesita por ejemplo someter las microalgas a un estrés nutricional que limita su crecimiento cuando se desea hacerle producir importantes reservas lipídicas.

Por lo tanto, se procede clásicamente al desacoplamiento crecimiento/producción en los procedimientos fermentativos.

15 Por ejemplo, para favorecer la acumulación de ácidos grasos poliinsaturados (aquí el ácido docosahexaenoico o DHA), la solicitud de patente WO 01/54510 recomienda disociar el crecimiento celular y la producción de ácidos grasos poliinsaturados.

Está más particularmente reivindicado un procedimiento para la producción de lípidos microbianos, que comprende las etapas que consisten en:

20 (a) efectuar una fermentación de un medio que comprende unos microorganismos, una fuente de carbono y una fuente nutritiva limitante y asegurando unas condiciones suficientes para mantener un porcentaje de oxígeno disuelto en al menos alrededor del 4% de la saturación en dicho medio de fermentación para aumentar la biomasa;

25 (b) después proporcionar unas condiciones suficientes para mantener un porcentaje de oxígeno disuelto aproximadamente igual o inferior al 1% de la saturación en dicho medio de fermentación y proporcionar unas condiciones suficientes para permitir a dichos microorganismos producir dichos lípidos;

(c) y recoger dichos lípidos microbianos, en los que al menos alrededor del 15% de dichos lípidos microbianos están constituidos de lípidos poliinsaturados;

y en el que una densidad de biomasa de al menos alrededor de 100 g/l se obtiene durante la fermentación.

30 En la microalga *Schizochytrium sp* cepa ATCC 20888, se procede así más particularmente a una primera fase de crecimiento en presencia de una fuente carbonada y de una fuente nitrogenada, pero sin limitación en oxígeno, a fin de favorecer la obtención de una alta densidad celular y después, en una segunda fase, detener la aportación de nitrógeno y ralentizar progresivamente la aportación en oxígeno (gestión de la presión en oxígeno disuelto o pO<sub>2</sub> del 10% al 4%, y después el 0,5%), con el fin de estresar la microalga, ralentizar su crecimiento e iniciar la producción de los ácidos grasos de interés.

35 Li J. *et al.* (OMICS A Journal of Integrative Biology, vol. 17(5), 2013, páginas 269-281) divulga un procedimiento de enriquecimiento de una biomasa de microalgas del género *Schizochytrium* en aminoácidos. En la microalga *Cryptocodinium cohnii*, el contenido más elevado en DHA se obtiene a baja concentración en glucosa (del orden de 5 g/l), y así a bajo porcentaje de crecimiento (Jiang y Chen, 2000, Process Biochem., 35(10), 1205-1209).

40 De este modo, en los casos en los que la formación de los productos no se correlaciona con un crecimiento celular elevado, se enseña que es juicioso controlar el porcentaje de crecimiento celular.

En general, el experto en la materia elige controlar el crecimiento de las microalgas por el control de las condiciones de fermentación (temperatura, pH, etc.) o por la alimentación regulada en componentes nutricionales del medio de fermentación (condiciones semi continuas denominadas "fed-batch").

45 Si elige controlar el crecimiento de las microalgas en heterotrofia mediante la aportación en fuentes carbonadas, el experto en la materia elige generalmente adaptar la fuente carbonada (glucosa pura, acetato, etanol, etc.) a la microalga (*C. cohnii*, *Euglena gracilis*, etc.) en función del metabolito producido (por ejemplo un ácido graso poliinsaturado de tipo DHA).

50 La temperatura puede también ser un parámetro clave. Por ejemplo, se ha detallado que la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados en algunas especies de microalgas, tal como EPA por *Chlorella minutissima*, se favorece a una temperatura más baja que la requerida para el crecimiento óptimo de dicha microalga.

Para optimizar la producción en triglicéridos, el experto en la materia tendrá también que optimizar el flujo carbonado hacia la producción de aceite, actuando sobre el entorno nutricional del medio de fermentación.

Así, se conoce que la acumulación de aceite se produce durante una aportación carbonada suficiente, pero en condiciones de carencia de nitrógeno.

5 La relación C/N es por lo tanto aquí determinante, y se admite que los mejores resultados se obtienen actuando directamente sobre el contenido de nitrógeno, no siendo el contenido de glucosa limitante.

10 Para optimizar la producción de aceite, es, por lo tanto, primordial para el experto en la materia controlar el flujo carbonado desviándolo hacia la producción de aceite, en detrimento de la producción de las proteínas; el flujo carbonado se redistribuye y se acumula en sustancias de reserva lipídicas cuando las microalgas se coloquen en medio carente de nitrógeno.

Producción de proteínas por las microalgas

Como se ha detallada anteriormente, para optimizar la producción de triglicéridos, el experto en la materia tiene que optimizar el flujo carbonado hacia la producción de aceite, actuando sobre el entorno nutricional del medio de fermentación.

15 En un estudio realizado en una microalga de tipo *Chlorella*, se ha observado que una carencia de nitrógeno afecta el crecimiento celular, lo que resulta en un porcentaje de crecimiento disminuido del 30% con respecto al porcentaje de crecimiento normal de la microalga (Xiong *et al.*, Plant Physiology, 2010, 154, p.1001-1011).

20 Para explicar este resultado, Xiong *et al.*, en el artículo citado anteriormente, demuestran en efecto que, si se divide la biomasa de *Chlorella* en sus 5 componentes principales, en particular hidratos de carbono, lípidos, proteínas, ADN y ARN (que representa el 85% de su materia seca), la relación C/N no tiene ningún impacto sobre el contenido de ADN, ARN e hidratos de carbono, pero se vuelve preeminente para el contenido de proteínas y de lípidos.

Es por eso que las células de *Chlorella* cultivadas con una relación C/N baja contienen un 25,8% de proteínas y un 25,23% de lípidos, mientras que una relación C/N elevada permite la síntesis de un 53,8% de lípidos y un 10,5% de proteínas.

25 Para optimizar la producción de proteínas, es, por lo tanto, primordial para el experto en la materia controlar el flujo carbonado desviándolo hacia la producción de proteínas en detrimento de la producción de lípidos; el flujo carbonado se redistribuye y se acumula en sustancias de reserva proteicas cuando las microalgas están colocadas en medio no carente de nitrógeno.

30 Con arreglo a esta enseñanza, para la producción de biomásas ricas en proteínas y por lo tanto en aminoácidos que las constituyen, el experto en la materia tiene por lo tanto que trabajar las condiciones de fermentación favoreciendo en cambio una relación C/N baja, y por lo tanto:

- realizar una aportación importante de fuente de nitrógeno al medio de fermentación, manteniendo al mismo tiempo constante la carga de fuente carbonada que se convertirá en proteínas, y

- estimular el crecimiento de la microalga.

35 Resumen de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento de producción de una biomasa de microalgas del género *Thraustochytrium* cuya fracción lipídica es rica en DHA y cuyo contenido de aminoácidos arginina y ácido glutámico sobre aminoácidos totales es elevado.

40 Este procedimiento se basa en el control del porcentaje de crecimiento de la microalga, ejerciéndose este control a fin de reducirlo a su mínimo, manteniendo al mismo tiempo o introduciendo en continuo una fuente de nitrógeno en el medio de fermentación.

Este resultado puede obtenerse, por ejemplo, por la reducción o el agotamiento de oligoelementos del medio de fermentación o por la limitación de la transferencia en O<sub>2</sub>.

45 En un modo preferido de realización del procedimiento conforme a la invención, se elige así limitar el porcentaje de crecimiento de la microalga limitando la aportación de oxígeno.

En el sentido de la invención, la limitación del porcentaje de crecimiento se aprecia por la relación entre el porcentaje de crecimiento real de la microalga ( $\mu$ ) frente a su porcentaje de crecimiento óptimo ( $\mu_{max}$ ), en el que " $\mu$ " es la velocidad de crecimiento expresada en g de biomasa formada por g de biomasa y por hora, es decir ( $h^{-1}$ ).

50 Más particularmente, el procedimiento de la invención es un procedimiento de enriquecimiento de una biomasa de microalgas del género *Thraustochytrium* en DHA y en aminoácidos arginina y ácido glutámico, caracterizado por que

comprende una etapa que consiste en mantener o añadir una fuente de nitrógeno en el medio de fermentación cuando el valor de la relación de los porcentajes de crecimiento  $\mu/\mu_{max}$  de las microalgas se vuelve inferior a 0,2.

Preferentemente, las microalgas son del género *Schizochytrium sp* o *Schizochytrium mangrovei*.

5 De manera más específica, las microalgas pueden ser una cepa seleccionada entre las cepas CNCM I-4469 y CNCM I-4702 depositadas a la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos del instituto Pasteur respectivamente el 14 de abril de 2011 y el 22 de noviembre de 2012.

Facultativamente, el procedimiento puede comprender además la recogida de la biomasa, eventualmente la preparación de un extracto o lisado celular a partir de esta biomasa, después facultativamente la extracción de un aceite bruto rico en DHA y en aminoácidos arginina y ácido glutámico.

10 El procedimiento según la presente invención se puede caracterizar por que la biomasa obtenida comprende:

- como mínimo un 45% de DHA en peso de ácidos grasos totales; y

- como mínimo un 10% de arginina y al menos un 25% de ácido glutámico en peso sobre aminoácidos totales, preferentemente como mínimo un 15% de arginina y al menos un 40% de ácido glutámico en peso sobre aminoácidos totales.

15 Descripción detallada de la invención

En el ámbito de la invención, la compañía solicitante ha elegido explorar una vía original de optimización de la producción de DHA y de aminoácidos arginina y ácido glutámico proponiendo un nuevo conducto de fermentación.

La compañía solicitante ha encontrado así, lo que va en contra de los prejuicios técnicos en la materia, que es posible producir por fermentación unas biomásas de microalgas:

20 - ricas en lípidos (más del 25% en peso seco de biomasa, preferentemente como mínimo un 30%) de los cuales el ácido graso preponderante es el ácido docosahexaenoico (DHA), y

- ricas en aminoácidos arginina y ácido glutámico (más del 35% en peso de los aminoácidos totales, preferentemente como mínimo un 55%),

25 sin que sea indispensable, como se describe en el estado de la técnica, maximizar la relación C/N (carbono consumido sobre nitrógeno consumido mol/mol).

La compañía solicitante ha encontrado así que se puede modificar la composición en lípidos y en aminoácidos de la biomasa producida por fermentación, gracias al mantenimiento, no convencional para una producción de lípidos, de la alimentación en nitrógeno a lo largo de la fermentación, incluso cuando el porcentaje de crecimiento  $\mu/\mu_{max}$  es inferior a 0,2.

30 En efecto, la compañía solicitante ha entendido que cuando la relación  $\mu/\mu_{max}$  se vuelve inferior a 0,2, tras una limitación en un sustrato nutritivo diferente de los sustratos nitrogenados o carbonados, es posible desviar las producciones metabólicas hacia la producción de aminoácidos arginina y ácido glutámico, conservando al mismo tiempo una producción de DHA importante.

35 En un modo de realización, la limitación que permite disminuir el porcentaje de crecimiento puede ser la limitación de la aportación en oxígeno (OTR, velocidad de transferencia del oxígeno).

En particular, el OTR durante la fase de fermentación es preferentemente de 30 a 35 mmoles//h.

La limitación de crecimiento puede también inducirse por el agotamiento de oligoelementos o minerales, preferentemente seleccionados entre el fosfato, el magnesio o el potasio.

40 Más particularmente, la compañía solicitante ha encontrado que se necesita realizar una aportación de nitrógeno, preferiblemente en forma de amoniaco (utilizado por ejemplo en la regulación de pH), o que se necesita mantener la aportación en nitrógeno, hasta el final del cultivo, cuando  $\mu$  vale menos del 20% de  $\mu_{max}$ .

45 En un modo de realización preferido, la aportación de nitrógeno inicial se completa por la regulación del pH, consumiéndose el nitrógeno así compensado por el de la regulación del pH. Esto permite obtener una relación C/N (carbono consumido sobre nitrógeno consumido mol/mol) al final del cultivo inferior a 20, por ejemplo comprendido entre 10 y 15, y preferentemente de aproximadamente 15.

Las cepas a utilizar en los métodos de la presente invención son del género *Thraustochytrium*, más particularmente *Schizochytrium mangrovei* o *Schizochytrium sp*. Tales cepas son conocidas por el experto en la materia.

La compañía solicitante ha identificado, durante sus búsquedas, varias cepas de microalgas productoras de DHA de

gran interés. En particular, la compañía solicitante está muy particularmente interesada por dos cepas que ha identificado.

5 La primera cepa es una cepa de *Schizochytrium sp.*, depositada en Francia el 14 de abril de 2011 en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos del instituto Pasteur (CNCM), 25 rue de Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, Francia, bajo el número I-4469 pero también en China en la CHINA CENTER FOR TYPE CULTURE COLLECTION (CCTCC) de la universidad de Wuhan, Wuhan 430072, P.R. China bajo el número M 209118. Esta cepa produce principalmente un DHA y en menor medida ácido palmítico y ácido palmitoleico. Se ha caracterizado por secuenciación parcial del gen que codifica el ARN 18S (SEQ ID nº 1):

```

1   GAGGGTTTTA CATTGCTCTC aTTCCaATAG CAaGACGCGA AGCGCCCCGC ATTGATATTT
61  CTCGTCACTA CCTCGTGGAG TCCACATTGG GTAATTTACG CGCCTGCTGC CTTCCITTGA
121 TGTGGTAGCC GICTCTCAGG CTCCCTCTCC GGAGTCGAGC CCTAACTCCC CGTCACCCGT
181 TATAGTCACC GTAGGCCAAT ACCCTACCGT CGACAACCTGA TGGGGCAGAA ACTCAAACGA
241 TTCATCGCTC CGAAAAGCGA TCTGCTCAAT TATCATGACT CACCAAGAGA GTTGGCTTAG
301 ACCTAATAAG TGCGGCCCTC CCCGAAAGTC GGGCCCGTAC AGCACGTATT AATTCCAGAA
361 TTAGTGCAGG TATCCGTATA AAGGAACCTAC CGAAGGGATT ATAACCTGATA TAATGAGCCG
10  421 TTCGCAGTTT CACAGTATAA TTCGCTTATA CTTACACATG CATGGCTTAG TCTTTGAGA

```

lo que ha permitido identificarla como siendo una cepa de tipo *Schizochytrium sp.* Esta cepa se designará "CNCM 1-4469" ulteriormente en la presente solicitud.

15 Por otro lado, la segunda cepa es una cepa de *Schizochytrium mangrovei*. Produce DHA y ácido palmítico en proporción relativamente igual. Se ha depositado por la compañía solicitante en Francia el 22 de noviembre de 2012 en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos del instituto Pasteur (CNCM), 25 rue de Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, Francia, bajo el número CNCM I-4702. Se ha caracterizado por secuenciación de los genes que codifican ARNr 18 S (SEW ID nº 2):

```

1   GGTTTTACAT TGCTCTCATT CCGATAGCAA AACGCATACA CGCTTCGCAT CGATATTTCT
61  CGTCCCTACCT CGTGGAGTCC ACAGTGGGTA ATTTACGCGC CTGCTGCTAT CCTTGGATAT
121 GGTAGCCGTC TCTCAGGCTC CCTCTCCGGA GTCGAGCCCT AACTCTCCGT CACCCGTTAT
181 AGTCACCGTA GTCCAATACA CTACCGTCTGA CAACTGATGG GGCAGAAACT CAAACGATTC
241 ATCGACCAAA AWAGTCAATC TGCTCAATTA TCATGATTCA CCAATAAAAT CGGCTTCAAT
301 CTAATAAGTG CAGCCCCATA CAGGGCTCTT ACAGCATGTA TTATTTCCAG AATTACTGCA
361 GGTATCCATA TAAAAGAAAC TACCGAAGAA ATTATTACTG ATATAATGAG CCGTTCGCAG
421 TCTCACAGTA CAATCGCTTA TACTTACACA GCAG

```

20 lo que ha permitido identificarla como siendo una cepa de tipo *Schizochytrium mangrovei*. Esta cepa se designará "CNCM I-4702" ulteriormente en la presente solicitud.

Por otro lado, los procedimientos fermentativos según la presente invención se realizan en condiciones de cultivo heterotróficos. Estas condiciones adaptadas a las microalgas consideradas, así como los medios de cultivo se conocen bien por el experto en la materia.

La fuente carbonada necesaria para el crecimiento de la microalgas es preferiblemente la glucosa.

25 Preferentemente, la aportación de glucosa es tal que la concentración de glucosa durante la fermentación se mantiene a una concentración de 20 g/l o más. Al final de la fermentación, la concentración de glucosa es de al menos 5 g/l.

La fuente de nitrógeno puede ser unos extractos de levadura, urea, glutamato de sodio, sulfato de amonio, amoniaco en regulación de pH, tomados solos o en combinación.

30 Generalmente, la etapa de cultivo comprende una etapa de precultivo, para revivificar la cepa, después una etapa de cultivo o de fermentación propiamente dicha. Esta última etapa corresponde a la etapa de producción de los lípidos de interés, en particular de DHA.

Preferentemente, el pH se regula durante la fermentación a un pH comprendido entre 5 y 7, preferiblemente alrededor de 6.

Preferentemente, la temperatura durante la fermentación es de 26-30°C, preferentemente alrededor de 28°C.

35 La duración de la fermentación es preferentemente de al menos 50 horas, preferentemente entre 65 y 90 horas, de manera aún más preferida entre 70 y 85 horas.

El procedimiento de fermentación según la presente invención permite (o se realiza con el fin de obtener) obtener una biomasa que comprende como mínimo un 45% de DHA en peso de ácidos grasos totales. Además, el procedimiento garantiza un porcentaje de lípidos en peso con respecto a la biomasa de al menos un 25%. Así, la biomasa se enriquece bien con DHA.

5 Por otro lado, el procedimiento de fermentación según la presente invención permite (o se realiza con el fin de obtener) obtener una biomasa que comprende como mínimo un 40% de proteínas en peso con respecto a la biomasa. Además, la proporción de ácido glutámico con respecto a los aminoácidos totales es de al menos un 25%. Aquella en arginina es de al menos un 10%.

10 Para la cepa CNCM I-4702, los resultados obtenidos con el procedimiento de fermentación según la invención son una biomasa que comprende aproximadamente un 47% de DHA en peso de ácidos grasos totales con un porcentaje de lípidos en peso con respecto a la biomasa de aproximadamente un 35%, y de aproximadamente un 53% de proteínas con una proporción de ácido glutámico de aproximadamente un 40% y de arginina de aproximadamente un 16%.

15 Para la cepa CNCM I-4469, los resultados obtenidos con el procedimiento de fermentación según la invención son una biomasa que comprende aproximadamente un 52% de DHA en peso de ácidos grasos totales con un porcentaje de lípidos en peso con respecto a la biomasa de aproximadamente un 26%, y de aproximadamente un 43% de proteínas con una proporción de ácido glutámico de aproximadamente un 26% et de arginina de aproximadamente un 10%.

Cuando se hace referencia a un porcentaje en peso, se entiende en peso seco.

20 Además de la biomasa, la presente invención se refiere también a un extracto o lisado celular preparado a partir de esta biomasa. En particular, este extracto o lisado se prepara a partir de la biomasa recuperada después de la fermentación. Este extracto o lisado es rico en DHA y en aminoácidos arginina y ácido glutámico.

La ruptura de las células para la extracción del contenido lipídico se puede efectuar mediante diferentes vías entre las cuales las vías mecánica, química, enzimática.

25 A continuación, se puede extraer un aceite del lisado celular.

Así, el método de producción de lípidos de interés, preferentemente DHA, y de aminoácidos arginina y ácido glutámico, comprende el procedimiento de fermentación según la presente invención, la recogida de la biomasa, la preparación de un extracto o lisado celular y la extracción de un aceite bruto que comprende los lípidos de interés, preferentemente DHA, y facultativamente de aminoácidos arginina y ácido glutámico.

30 Por "aproximadamente" se entiende el valor + o - 10% de este, preferentemente + o - 5% de este.

La invención se entenderá mejor con la ayuda de los ejemplos siguientes, los cuales quieren ser ilustrativos y no limitativos.

**Ejemplos**

**Ejemplo 1:** Condiciones de cultivo de la cepa CNCM I-4702

35 El protocolo comprende un precultivo para una inoculación del fermentador a 0,1 g/l de biomasa para la cepa *Schizochytrium mangrovei* CNCM I-4702.

Precultivo

El precultivo (100 ml de medio) en un matraz Erlenmeyer de 500 ml con deflectores dura 24h a 28°C. El conjunto de los componentes del medio se esteriliza por filtración.

40 Tabla I

Medio de precultivo	% (g/g)
Glucosa anhidra	3
Extracto de levadura	0,4
Glutamato de sodio monosódico	6,42
NaCl	1,25



## ES 2 718 771 T3

MgSO <sub>4</sub> 7(H <sub>2</sub> O)	0,4
KCl	0,05
CaCl <sub>2</sub> 2(H <sub>2</sub> O)	0,01
NaHCO <sub>3</sub>	0,05
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,4
Vitaminas solución madre B1, B6, B12	0,1
Oligoelementos solución madre	0,8

El cultivo

El medio se esteriliza en 3 partes.

La glucosa se esteriliza con KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> para una adición justo antes de T<sub>0</sub>.

- 5 El resto de las sales se esteriliza en un fermentador con 0,75 ml/l de Clearol FBA 3107. Los oligoelementos y vitaminas se esterilizan por filtración.

El volumen a T<sub>0</sub> representa un 75% del volumen final. El pH se ajusta a T<sub>0</sub> por amoníaco y después se regula a 6 siempre con amoníaco.

Tabla II

10

Medio de cultivo	% (P/P)
<i>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></i>	0,80
<i>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></i>	0,33
<i>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></i>	0,67
<i>NaCl</i>	0,27
<i>Ca Cl<sub>2</sub> 2 (H<sub>2</sub>O)</i>	0,03
<i>Mg SO<sub>4</sub> 7(H<sub>2</sub>O)</i>	1,00
<i>Glucosa anhidra</i>	6,00
<i>Vitaminas solución madre B1, B6, B12</i>	0,20
<i>Oligoelementos solución madre</i>	0,27

Se aporta en continuo un Fed-batch de glucosa (concentración: 500 g/l) a partir de T<sub>0</sub> a un ritmo constante (a adaptar según cálculos) para no estar a una concentración inferior a 20 g/l. Al final, se agotará la glucosa sin bajar debajo de los 5 g/l durante la detención de la fermentación.

- 15 El cultivo se lleva a 28°C y dura de 70 a 85 horas con un OTR ("oxigen uptake rate" o velocidad de transferencia del oxígeno) fija y constante de 20 a 30 mmoles de O<sub>2</sub>/l/h.

Soluciones madres

vitaminas	g/l
B1	45
B6	45

B12	0,25
-----	------

Oligoelementos	g/l
MnCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	8,60
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,2
NiSO <sub>4</sub> 6H <sub>2</sub> O	7,50
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,15
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	5,70
Cu So <sub>4</sub> 5h <sub>2</sub> O	6,50
FeSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	32,00
Acetato de Zinc	0,01
EDTA	Puesto a pH > 3

Se utilizan dos condiciones de fermentación:

- 5 - en control: condiciones denominadas “estándar”, en las que se maximiza la relación C/N (carbono consumido sobre nitrógeno consumido) a fin de producir esencialmente unos lípidos interrumpiendo la aportación de nitrógeno pero no la del sustrato carbonado, sin limitación en O<sub>2</sub>. Estas condiciones están, por lo tanto, carentes de nitrógeno.

10 La sobreexpresión de la aportación en nitrógeno se efectúa cuando una o varias sales se agotan. El crecimiento propiamente dicho es entonces imposible o muy limitado: la velocidad de multiplicación celular cae en beneficio del enriquecimiento en lípidos de las células presentes. La masa global de las células aumenta, pero el número de células evoluciona poco ya que el porcentaje de crecimiento cae.

- según la invención: condiciones que permiten producir unos lípidos ricos en DHA con unos aminoácidos ricos en arginina y ácido glutámico limitando la velocidad de crecimiento por la limitación de la transferencia de O<sub>2</sub> de manera que  $\mu$  cae a  $\mu/\mu_{max} < 0,2$  rápidamente, manteniendo al mismo tiempo la aportación de la glucosa y del nitrógeno preferiblemente gracias a la regulación de pH con amoniaco.

- 15 La figura 1 presenta la evolución de la proporción de arginina y ácido glutámico entre los aminoácidos en función del C/N calculado al final del cultivo.

Parece que el procedimiento favorece la producción de aminoácidos arginina y ácido glutámico cuando la relación C/N es inferior a 15 ( $n^\circ \mu/\mu_{max} < 0,2$ ).

- 20 La tabla III siguiente traduce, para la cepa CNCM I-4702, la composición en ácidos grasos y aminoácidos de la biomasa producida según las condiciones de realizaciones “clásicas” y conforme a la invención.

Tabla III

		Cultivo clásico	Utilización del procedimiento de la invención
Lípidos sobre biomasa	(g/g)	0,60	0,35
<b>Proteínas sobre biomasa según N 6,25</b>	<b>(g/g)</b>	<b>0,12</b>	<b>0,53</b>
<b>DHA / Ácidos grasos</b>	<b>(g/g)</b>	<b>0,24</b>	<b>0,47</b>
Ácido aspártico sobre $\Sigma$ AAT	(g/g)	0,12	0,05
Treonina sobre $\Sigma$ AAT	(g/g)	0,06	0,03

Serina sobre $\Sigma$ AAT	(g/g)	0,06	0,03
<b>Ácido glutámico sobre <math>\Sigma</math> AAT</b>	<b>(g/g)</b>	<b>0,11</b>	<b>0,40</b>
Glicina sobre $\Sigma$ AAT	(g/g)	0,05	0,03
Alanina sobre $\Sigma$ AAT	(g/g)	0,07	0,04
Valina sobre $\Sigma$ AAT	(g/g)	0,06	0,03
Isoleucina sobre $\Sigma$ AAT	(g/g)	0,05	0,03
Leucina sobre $\Sigma$ AAT	(g/g)	0,08	0,04
Tirosina sobre $\Sigma$ AAT	(g/g)	0,04	0,02
Fenilalanina sobre $\Sigma$ AAT	(g/g)	0,04	0,03
Lisina sobre $\Sigma$ AAT	(g/g)	0,07	0,04
Histidina sobre $\Sigma$ AAT	(g/g)	0,02	0,01
<b>Arginina sobre <math>\Sigma</math> AAT</b>	<b>(g/g)</b>	<b>0,06</b>	<b>0,16</b>
Prolina sobre $\Sigma$ AAT	(g/g)	0,05	0,03
Cistina sobre $\Sigma$ AAT	(g/g)	0,02	0,01
Metionina sobre $\Sigma$ AAT	(g/g)	0,03	0,02
Triptófano sobre $\Sigma$ AAT	(g/g)	0,02	0,01

La proporción de ácido glutámico sobre la suma de los aminoácidos se multiplica por 3,75 y la proporción de arginina sobre la suma de los aminoácidos se multiplica por 2,75.

La composición de lípido se reduce, pero el contenido de DHA de los ácidos grasos se multiplica casi por dos.

5 **Ejemplo 2:** Condiciones de cultivos de la cepa CNCM I-4469

Las condiciones de cultivo de esta microalga son las mismas que las del ejemplo 1 (con la excepción del porcentaje de inóculo elegido en precultivo, del orden de 5 g/l para *Schizochytrium sp.*).

Según dos condiciones de cultivo llevadas a cabo de manera "clásica" y según la invención.

10 La tabla IV siguiente traduce la composición de ácidos grasos y aminoácidos de la biomasa producida según las condiciones de realización "clásicas" y conforme a la invención.

Tabla IV

		<b>Cultivo clásico</b>	<b>Utilización del procedimiento de la invención</b>
Lípidos sobre biomasa	(g/g)	0,46	0,26
<b>Proteínas sobre biomasa según N 6,25</b>	<b>(g/g)</b>	<b>0,21</b>	<b>0,43</b>
<b>DHA / Ácidos grasos</b>	<b>(g/g)</b>	<b>0,42</b>	<b>0,52</b>
Ácido aspártico sobre $\Sigma$ AAT	(g/g)	0,12	0,08
Treonina sobre $\Sigma$ AAT	(g/g)	0,05	0,04
Serina sobre $\Sigma$ AAT	(g/g)	0,05	0,04

<b>Ácido glutámico sobre <math>\Sigma</math> AAT</b>	<b>(g/g)</b>	<b>0,15</b>	<b>0,26</b>
Glicina sobre $\Sigma$ AAT	(g/g)	0,05	0,05
Alanina sobre $\Sigma$ AAT	(g/g)	0,08	0,06
Valina sobre $\Sigma$ AAT	(g/g)	0,06	0,05
Isoleucina sobre $\Sigma$ AAT	(g/g)	0,04	0,03
Leucina sobre $\Sigma$ AAT	(g/g)	0,08	0,06
Tirosina sobre $\Sigma$ AAT	(g/g)	0,04	0,03
Fenilalanina sobre $\Sigma$ AAT	(g/g)	0,04	0,03
Lisina sobre $\Sigma$ AAT	(g/g)	0,06	0,05
Histidina sobre $\Sigma$ AAT	(g/g)	0,02	0,02
<b>Arginina sobre <math>\Sigma</math> AAT</b>	<b>(g/g)</b>	<b>0,06</b>	<b>0,10</b>
Prolina sobre $\Sigma$ AAT	(g/g)	<b>0,04</b>	<b>0,07</b>
Cistina sobre $\Sigma$ AAT	(g/g)	0,02	0,01
Metionina sobre $\Sigma$ AAT	(g/g)	0,02	0,02
Triptófano sobre $\Sigma$ AAT	(g/g)	0,02	0,01

Para la cepa *Schizochytrium sp.*, los efectos son idénticos, pero de menor amplitud. Por otro lado, se observa también un aumento del 75% de la proporción de prolina entre los aminoácidos.

5 Los contenidos de aminoácidos arginina y ácido glutámico aumentan respectivamente del 60 al 75% mientras que el contenido en proteínas se duplica.

El contenido en DHA en los ácidos grasos aumenta del 23%.

#### Listado de secuencias

<110> ROQUETTE FRERES

10 <120> PROCEDIMIENTO DE ENRIQUECIMIENTO DE LA BIOMASA DE MICROALGAS DEL GÉNERO TRAUSTOCHYTRIUM EN DHA Y EN AMINOÁCIDOS ARG Y GLU

<130> B1954PC

<160> 2

<170> PatentIn version 3,5

<210> 1

15 <211> 479

<212> ADN

<213> *Schizochytrium sp.*

<400> 1

ES 2 718 771 T3

gagggtttta cattgctctc attccaatag caagacgga agcgccccgc attgatattt 60  
 ctcgtaacta cctcgtggag tccacattgg gtaatttacg cgcctgctgc cttccttggg 120  
 tgtggtagcc gtctctcagg ctccctctcc ggagtcgagc cctaactccc cgtcacccgt 180  
 tatagtcacc gtagggcaat accctaccgt cgacaactga tggggcagaa actcaaacga 240  
 ttcctcgtc cgaaaagcga tctgctcaat tatcatgact caccaagaga gttggcttag 300  
 acctaataag tgcggccctc cccgaaagtc gggcccgtac agcacgtatt aattccagaa 360  
 ttactgcagg tatccgtata aaggaactac cgaagggtatt ataactgata taatgagccg 420  
 ttcgcagttt cacagtataa ttcgcttata cttacacatg catggcttag tctttgaga 479

<211> 454

<212> ADN

<213> *Schizochytrium mangrovei*

5 <400> 2  
 ggttttacat tgctctcatt ccgatagcaa aacgcataca cgcttcgcat cgatatttct 60  
 cgtcctacct cgtggagtc acagtgggta atttacgccc ctgctgctat ccttgatat 120  
 ggtagccgtc tctcaggctc cctctccgga gtcgagccct aactctccgt caccggttat 180  
 agtcaccgta gtccaataca ctaccgtcga caactgatgg ggcagaaact caaacgattc 240  
 atcgaccaa awagtcaatc tgctcaatta tcatgattca ccaataaaat cggcttcaat 300  
 ctaataagtg cagccccata cagggctctt acagcatgta ttatttccag aattactgca 360  
 ggtatccata taaaagaaac taccgaagaa attattactg atataatgag ccgcttcgag 420  
 tctcacagta caatcgctta tacttacaca gcag 454

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento de enriquecimiento de una biomasa de microalgas del género *Thraustochytrium* en ácido docosahexaenoico (DHA) y en aminoácidos arginina y ácido glutámico, caracterizado por que comprende una etapa que tiene como objetivo limitar el porcentaje de crecimiento de la microalga manteniendo al mismo tiempo o introduciendo en continuo una fuente de nitrógeno en el medio de fermentación cuando el valor de la relación de los porcentajes de crecimiento  $\mu/\mu_{max}$  de las microalgas se vuelven inferior a 0,2.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que las microalgas son del género *Schizochytrium sp* o *Schizochytrium mangrovei*.
- 10 3. Procedimiento según una u otra de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que las microalgas son una cepa seleccionada entre las cepas CNCM I-4469 y CNCM I-4702 depositadas a la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos del Instituto Pasteur respectivamente el 14 de abril de 2011 y el 22 de noviembre de 2012.
- 15 4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la limitación del porcentaje de crecimiento de la microalga se obtiene por la reducción o el agotamiento de oligoelementos del medio de fermentación o por la limitación de la transferencia en O<sub>2</sub>, preferentemente por la limitación de la transferencia en O<sub>2</sub>.
5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que comprende además la recogida de la biomasa, eventualmente la preparación de un extracto o lisado celular a partir de esta biomasa, después facultativamente la extracción de un aceite bruto rico en DHA.
- 20 6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la biomasa obtenida comprende como mínimo un 45% de DHA en peso de ácidos grasos totales.
7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la biomasa obtenida comprende como mínimo un 40% de proteínas en peso de biomasa (g/g) expresadas en N,6,25 de las cuales como mínimo un 10% de arginina y como mínimo 25% de ácido glutámico en peso sobre los aminoácidos totales.

Figura 1

