

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 837**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/12** (2006.01)

**C12P 19/04** (2006.01)

**C12P 21/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.03.2014 PCT/JP2014/058063**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14157077**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.03.2014 E 14772875 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 2980205**

54 Título: **Microalgas euglena spp., método de fabricación de polisacárido y método de fabricación de compuesto orgánico**

30 Prioridad:

**27.03.2013 JP 2013067558**

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

**06.11.2019**

73 Titular/es:

**KOBELCO ECO-SOLUTIONS CO., LTD (100.0%)  
4-78 Wakinohama-cho 1-chome, Chuo-ku  
Kobe-shi, Hyogo 651-0072, JP**

72 Inventor/es:

**WATANABE, MAKOTO;  
DEMURA, MIKIHIDE;  
KAWACHI, MASANOBU;  
SATO, NATSUKI;  
AKASHI, AKIRA;  
TAKEZAKI, JUN;  
HAMADA, TAKESHI;  
TAKAHASHI, MADOKA y  
OHIRAKI, KENJI**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 729 837 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

Microalgas euglena spp., método de fabricación de polisacárido y método de fabricación de compuesto orgánico

### Campo

5 La presente invención se refiere a microalgas del género *Euglena*, un método para producir polisacáridos y un método para producir un compuesto orgánico.

### Antecedentes

Las microalgas del género *Euglena* también se llaman *Euglena*, y son conocidas como microorganismos que producen polisacáridos, tales como paramilo o similares mediante su cultivo.

10 Convencionalmente se conocen diversas microalgas del género *Euglena*. Por ejemplo, la cepa NIES-48 de *Euglena gracilis* es conocida (Literatura de Patente 1 y Documento 1), la WZSL mutante de *E. gracilis* (Documento 2), la cepa blanqueada Z de *E. gracilis* (Documento 3).

Dichas microalgas del género *Euglena* producen polisacáridos, tales como paramilo mediante su cultivo, y almacenan los polisacáridos en sus células.

15 Además, las microalgas del género *Euglena* pueden convertir los polisacáridos almacenados en ésteres cerosos o pueden producir adicionalmente proteínas mientras se producen los polisacáridos, dependiendo de las condiciones de cultivo. Después, los compuestos orgánicos, tales como polisacáridos, lípidos y proteínas que se producen y almacenan de las células de las microalgas pueden usarse en aplicaciones, tales como combustibles y alimentos.

Sin embargo, las microalgas del género *Euglena* tienen un problema en que el rendimiento para producir un compuesto orgánico, tal como polisacáridos, no es necesariamente suficiente.

### 20 Lista de citas

Literatura de Patente

Literatura de Patente 1: JP H07-070207 A

Literatura

25 Documento 1: SANTEK B ET AL: "Production of paramylon, a [beta]-1,3-glucan, by heterotrophic cultivation of *Euglena gracilis* on a synthetic medium", ENGINEERING IN LIFE SCIENCES 2009, vol. 9, n.º 1, páginas 23-28,

Documento 2:

BARSANTI L ET AL: "Paramylon ([beta]-1,3-glucan) content in wild type and WZSL mutant of *Euglena gracilis*. Effects of growth conditions", Journal of Applied Phycology, 2001, páginas 59-65

Documento 3:

30 RODRIGUEZ-ZAVALA JS ET AL: "Increased synthesis of [alpha]-tocopherol, paramylon and tyrosine by *Euglena gracilis* under conditions of high biomass production", Journal of Applied Microbiology, vol. 109, n.º 6, 2010, páginas 2160-2172.

### Sumario

#### Problema técnico

35 A la vista de lo anterior y otros problemas, es un objeto de la presente invención proporcionar microalgas del género *Euglena* que se sean capaces de producir al menos polisacáridos de un modo suficiente. Es otro objeto de la presente invención proporcionar un método para producir polisacáridos que permita que se obtengan de un modo suficiente los polisacáridos. Es otro objeto más de la presente invención proporcionar un método para producir un compuesto orgánico que permita obtener de un modo suficiente al menos un compuesto orgánico seleccionado entre el grupo que consiste en polisacáridos, lípidos, vitamina C, vitamina E, pigmentos y proteínas.

40

#### Solución al problema

Para resolver el problema mencionado anteriormente, las microalgas del género *Euglena* de acuerdo con la presente invención se caracterizan por ser la cepa EOD-1 *Euglena gracilis* (N.º de acceso FERM BP-11530) que son capaces de producir al menos polisacáridos.

45 Un método para producir polisacáridos de acuerdo con la presente invención se caracteriza por cultivar microalgas del género *Euglena* que entran dentro de la cepa EOD-1 de *Euglena gracilis* (N.º de acceso FERM BP-11530) que son capaces de producir al menos polisacáridos, como organismos productores de polisacáridos para producir los polisacáridos.

De acuerdo con un aspecto del método para producir polisacáridos de la presente invención, un caldo usado en el

cultivo puede contener de 15 a 30 g/l de glucosa.

De acuerdo con otro aspecto del método para producir polisacáridos de la presente invención, el caldo usado en el cultivo puede contener lisado de levadura.

El caldo usado en el cultivo puede tener una composición de medio de cultivo AF6.

- 5 De acuerdo con otro aspecto más del método para producir polisacáridos de la presente invención, los polisacáridos pueden ser paramilo.

Un método para producir un compuesto orgánico de acuerdo con la presente invención se caracteriza por cultivar microalgas del género *Euglena* que entran dentro de la cepa EOD-1 de *Euglena gracilis* (N.º de acceso FERM BP-11530) capaz de producir al menos polisacáridos, para producir al menos un compuesto orgánico seleccionado entre el grupo que consiste en polisacáridos, lípidos, vitamina C, vitamina E, pigmentos y proteínas.

### **Breve descripción de los dibujos**

La Fig. 1 es una tabla de comparación para la secuencia de bases del gen 18S ARNr de *Euglena gracilis*.

La Fig. 2 es un árbol filogenético construido usando el gen 18S ARNr.

15 La Fig. 3A es una imagen que muestra un patrón de bandas en un análisis RAPD.

La Fig. 3B es una imagen que muestra un patrón de bandas en un análisis RAPD.

La Fig. 3C es una imagen que muestra un patrón de bandas en un análisis RAPD.

La Fig. 4 es un gráfico que muestra la conversión de glucosa de microalgas y el peso seco de microalgas en un cultivo heterotrófico.

20 La Fig. 5 es un gráfico que muestra el periodo de cultivo de microalgas y el peso seco de microalgas en un cultivo fotoheterotrófico.

La Fig. 6 es un gráfico que muestra el periodo de cultivo de microalgas y el peso seco de microalgas en cultivo fotoheterotrófico usando un medio de cultivo en condiciones de pH diferentes.

La Fig. 7 es un gráfico que muestra el periodo de cultivo de microalgas y el peso seco de microalgas en cultivo fotoheterotrófico usando un medio de cultivo en condiciones de pH diferentes.

25 La Fig. 8A es un gráfico que muestra el periodo de cultivo de microalgas y el contenido de paramilo por célula cuando las condiciones cambian de aeróbicas a anaeróbicas en un cultivo fotoheterotrófico.

La Fig. 8B es un gráfico que muestra el periodo de cultivo de microalgas y la cantidad de paramilo por caldo cuando las condiciones cambian de aeróbicas a anaeróbicas en un cultivo fotoheterotrófico.

30 La Fig. 9A es un gráfico que muestra el periodo de cultivo de microalgas y el contenido de lípidos por célula cuando las condiciones cambian de aeróbicas a anaeróbicas en un cultivo fotoheterotrófico.

La Fig. 9B es un gráfico que muestra el periodo de cultivo de microalgas y la cantidad de lípidos por caldo cuando las condiciones cambian de aeróbicas a anaeróbicas en un cultivo fotoheterotrófico.

### **Descripción de realizaciones**

35 Las microalgas del género *Euglena* de acuerdo con esta realización (en lo sucesivo en el presente documento, denominadas simplemente como microalgas del género *Euglena* o microalgas) son la cepa EOD-1 de *Euglena gracilis* (N.º de acceso FERM BP-11530), capaz de producir al menos polisacáridos.

Las microalgas del género *Euglena* de esta realización tiene el efecto de permitir que se produzca de un modo suficiente al menos polisacáridos.

40 Las microalgas del género *Euglena* son organismos que viven flotando en el agua. Además, las microalgas del género *Euglena* son microalgas unicelulares con un tamaño de aproximadamente 10 µm a 50 µm, que difiere dependiendo de las cepas.

Las propiedades de las microalgas del género *Euglena* se describen en detalle más adelante.

Propiedades morfológicas de microalgas del género *Euglena*

45 Las células vegetativas de las microalgas del género *Euglena* tienen flagelo y se mueven activamente. Además, cada célula tiene una forma casi fusiforme. La célula incluye un orgánulo rojo llamado mancha ocular además de orgánulos generales, tales como los núcleos, cloroplastos y mitocondrias.

Propiedades fisiológicas o bioquímicas de microalgas del género *Euglena*

50 (1) Medio de cultivo: Un caldo compuesto principalmente de agua dulce puede usarse para el crecimiento (también puede usarse para el crecimiento materia orgánica derivada de agua residual).

(2) Capacidad fotosintética: Es posible un crecimiento fotoautótrofo por fotosíntesis.

(3) Pigmentos contenidos: Clorofila a, clorofila b y otros carotenoides están contenidos.

(4) Sustancias anabólicas de almacenamiento: Proteínas, lípidos (ésteres cerosos) y polisacáridos (paramilo)

(5) Intervalo de temperatura de crecimiento: de 15 °C a 35 °C (temperatura óptima: 25 °C)

(6) Intervalo de pH adecuado para el crecimiento: pH de 3,5 a 5,5 (sin embargo, el crecimiento es posible a un

pH fuera del intervalo mencionado anteriormente)

Información genética de microalgas del género *Euglena*

Las microalgas del género *Euglena* tienen el 18S ADNr (gen 18S ARNr) representado por la Secuencia N.º 1.

5 El gen 18S ARNr puede analizarse por un método utilizado comúnmente como un método para identificar microalgas. Específicamente, puede analizarse el gen 18S ARNr, por ejemplo, por un método descrito en los EJEMPLOS.

10 La secuencia de bases del gen 18S ARNr de las microalgas del género *Euglena* puede compararse con la secuencia de bases del gen 18S ARNr de microalgas conocidas del género *Euglena* obtenidas de GenBank usando la búsqueda por homología BLAST. Los resultados de la comparación con las microalgas conocidas del género *Euglena* en el grado de coincidencia de homología de secuencia se mostrarán más adelante en los EJEMPLOS.

Como bases de datos, también pueden usarse, por ejemplo, EMBL y DDBJ.

Además, puede construirse un árbol filogenético molecular usando un programa de software de representación Mega 5 (Tamura et al., 2011, Mol. Biol. Evol. 28: 2731-2739) por el método de máxima verosimilitud. El árbol filogenético molecular construido se mostrará en detalle más adelante en los EJEMPLOS.

15 Usando la técnica que se ha descrito anteriormente, las microalgas del género *Euglena* mencionadas anteriormente se identificaron a partir de los resultados descritos posteriormente en los EJEMPLOS como *Euglena gracilis* y se nombraron como cepa EOD-1 de *Euglena gracilis*.

20 La cepa EOD-1 de *Euglena gracilis* ha sido depositada internacionalmente en el Organismo Depositario de Patentes, National Institute of Technology and Evaluation (NITE-IPOD: 2-5-8-120 Kazusakamatari, Kisarazu, Chiba 292-0818 Japón) el 28 de junio de 2013 (Fecha original del depósito: 25 de marzo de 2013) como N.º de acceso FERM BP-11530 en virtud de las disposiciones del Tratado de Budapest.

Como se ha descrito anteriormente, las microalgas del género *Euglena* tienen cloroplastos en sus células y, por lo tanto, pueden desarrollarse mediante fotosíntesis. Es decir, las microalgas del género *Euglena* son fotoautótrofas.

25 Además, las microalgas del género *Euglena* también pueden desarrollarse usando nutrientes orgánicos, tales como glucosa, como sus nutrientes. Es decir, las microalgas del género *Euglena* también son heterótrofas.

De este modo, las microalgas del género *Euglena* pueden desarrollarse únicamente de manera fotoautótrofa, pueden desarrollarse únicamente de manera heterótrofa o pueden desarrollarse de manera fotoautótrofa y heterótrofa concurrente.

30 Puede producirse una cepa mutante, por ejemplo, aplicando un proceso de mutación común, adaptación por subcultivo o mutación natural.

El proceso de mutación puede realizarse usando mutágenos comunes. Los ejemplos de los mutágenos incluyen fármacos que tienen actividad mutagénica y rayos ultravioleta. Los ejemplos de los fármacos que tienen actividad mutagénica incluyen análogos de nucleótidos base, tales como estreptomina, ofloxacina, metano sulfonato de etilo y N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, y bromouracilo, y acridinas.

35 A continuación, se describe una realización del método para producir polisacáridos de acuerdo con la presente invención.

De acuerdo con el método para producir polisacáridos de esta realización, al menos se producen polisacáridos cultivando las microalgas del género *Euglena*.

40 El método para producir polisacáridos de esta realización tiene el efecto de permitir que se obtengan polisacáridos de un modo suficiente.

Específicamente, el método para producir polisacáridos de esta realización incluye una etapa de cultivo de cultivar las microalgas del género *Euglena* en un caldo que contiene al menos agua.

El caldo contiene preferiblemente agua y nutrientes que promuevan el crecimiento de las microalgas.

Los ejemplos de los nutrientes incluyen nutrientes inorgánicos y nutrientes orgánicos.

45 Los ejemplos de los nutrientes inorgánicos incluyen compuestos inorgánicos que contienen nitrógeno y compuestos inorgánicos que contienen fósforo. Además, los ejemplos de los nutrientes inorgánicos incluyen ion de potasio, ion de hierro, ion de manganeso, ion de cobalto, ion de cinc, ion de cobre, ion de molibdeno y ion de níquel.

La concentración de los nutrientes inorgánicos en el caldo es generalmente aproximadamente una concentración que es comúnmente conocida.

Los ejemplos de los nutrientes orgánicos incluyen monosacáridos, tales como glucosa y fructosa, vitaminas, tales como vitaminas B<sub>6</sub> y B<sub>12</sub>, aminoácidos, tales como arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina e histidina, ácidos orgánicos, tales como ácido málico, ácido cítrico, ácido succínico y ácido acético, y alcoholes, tales como etanol.

- 5 Los ejemplos de la composición del caldo que va a emplearse incluyen la composición de "medio de cultivo AF-6", la composición de "medio de cultivo Cramer-Myers", la composición de "medio de cultivo Hutner ", que se describirá más adelante, o una composición similar a estas composiciones.

10 En la etapa de cultivo, el caldo contiene preferiblemente de 15 a 30 g/l de glucosa como fuente de carbono. Además, el caldo contiene preferiblemente lisado de levadura (que se describirá más adelante). Además, el caldo tiene preferiblemente la composición del medio de cultivo AF6.

La etapa de cultivo puede realizarse, por ejemplo, en un baño que contiene una mezcla del caldo mencionado anteriormente y las microalgas.

En la etapa de cultivo, la fotosíntesis de las microalgas puede provocarse irradiando las microalgas con luz. Es decir, en la etapa de cultivo, puede realizarse cultivo fotoautótrofo.

- 15 Cuando las microalgas se irradian con luz en la etapa de cultivo, las microalgas introducen dióxido de carbono en sus células mediante fotosíntesis, y pueden crecer mientras producen al menos polisacáridos, tales como paramilo. Además, las microalgas pueden crecer mientras producen proteínas y metabolitos secundarios, tales como lípidos, pigmentos y vitaminas.

20 La luz con la que se irradian las microalgas en la etapa de cultivo no está específicamente limitada siempre y cuando provoque la fotosíntesis de las microalgas. Como la luz, se emplea, por ejemplo, luz natural light del sol o luz artificial, tal como iluminación.

La intensidad de la irradiación de luz en la etapa de cultivo fotoautótrofa no está específicamente limitada, pero es generalmente de 50  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$  a 200  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ .

- 25 En la etapa de cultivo, pueden repetirse de forma alternativa un periodo durante el cual las microalgas se irradian con luz y un periodo durante el cual las microalgas no se irradian con luz.

Es decir, pueden repetirse de un modo alternativo en la etapa de cultivo un periodo durante el cual se realiza un cultivo fotoautótrofo y un periodo durante el cual no se realiza un cultivo fotoautótrofo.

30 El periodo de la irradiación de luz en la etapa de cultivo es generalmente de 8 horas a 15 horas, que es equivalente al periodo diurno durante el que brilla la luz del sol. Además, el periodo de condiciones de oscuridad durante el cual no se realiza la irradiación de luz para inhibir la fotosíntesis de las microalgas es generalmente de 9 horas a 16 horas, que es equivalente al periodo nocturno durante el cual no brilla la luz del sol. Estos periodos pueden cambiarse dependiendo de la situación o el propósito.

Las condiciones de oscuridad en las que no se realiza la irradiación de luz son las condiciones en las que la densidad de flujo fotónico fotosintético (PPFD) es 50  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$  o inferior.

- 35 Al mismo tiempo, el cultivo heterotrófico en el que se cultivan las microalgas en presencia de los nutrientes orgánicos incluidos en los nutrientes mencionados anteriormente puede realizarse en la etapa de cultivo. Cuando las microalgas se cultivan en presencia de los nutrientes orgánicos en la etapa de cultivo, las microalgas introducen los nutrientes orgánicos en sus células, y pueden crecer mientras producen al menos polisacáridos, tales como paramilo.

- 40 Es decir, al menos uno del cultivo fotoautótrofo y el cultivo heterotrófico puede realizarse en la etapa de cultivo.

Es preferible que el cultivo fotoautótrofo y el cultivo heterotrófico se realicen ambos en la etapa de cultivo al mismo tiempo, por que el crecimiento de las microalgas puede promoverse adicionalmente. Es decir, es preferible que el cultivo fotoheterotrófico se realice en la etapa de cultivo.

- 45 Es preferible emplear, como los nutrientes orgánicos usados en el cultivo heterotrófico y el cultivo fotoheterotrófico, alcoholes, tales como etanol, monosacáridos, tales como glucosa y fructosa, o residuos que contengan estos componentes que puedan ser usados por las microalgas del género Euglena, por ejemplo. Además, es preferible que se use levadura o lisado de levadura (en lo sucesivo en el presente documento, denominado también extracto de levadura) en combinación como nutrientes orgánicos, por que el crecimiento de las microalgas del género Euglena puede promoverse de una manera más fiable.

- 50 Los ejemplos de materiales que contienen al menos una parte de los nutrientes orgánicos mencionados anteriormente incluyen bebidas fermentadas, bebidas destiladas, posos de sake, posos de shochu, melaza y melaza negra. Dichas bebidas alcohólicas pueden usarse como una fuente de suministro de los nutrientes orgánicos en el cultivo heterotrófico y el cultivo fotoheterotrófico.

Las bebidas fermentadas se producen mediante fermentación alcohólica de un material de partida que contiene un contenido de azúcar con levadura, y no se destilan.

5 Las bebidas fermentadas no se destilan y contienen metabolitos de fermentación alcohólica con levadura. Por lo tanto, contienen nutrientes que incluyen sacáridos, tales como glucosa producida por levadura, proteínas, aminoácidos, vitaminas, fósforo y potasio, distintos de etanol y agua.

Los ejemplos de las bebidas fermentadas incluyen cerveza, sake, vino, una bebida fermentada usando cereales como material de partida, una bebida fermentada usando legumbres como material de partida, una bebida fermentada usando patatas como material de partida y una bebida fermentada usando azúcar como material de partida.

10 La cerveza se produce mediante sacarificación del almidón contenido en al menos la malta con una enzima contenida en la malta, produciendo de este modo azúcar, seguido de fermentación alcohólica del azúcar con levadura de cerveza. Es decir, la cerveza en esta descripción incluye productos adicionales usando otros materiales de partida, siempre y cuando se produzcan como se ha descrito anteriormente usando al menos malta como material de partida.

15 Como la malta, se utiliza generalmente malta de cebada.

El sake (sake japonés) se produce mediante sacarificación del almidón contenido en el arroz con malta de arroz, produciendo de este modo azúcar, seguido de fermentación alcohólica del azúcar con levadura.

El vino se produce por fermentación alcohólica de al menos zumo de uva con levadura.

20 Los ejemplos de la levadura incluyen organismos que pertenecen al género *Saccharomyces*, específicamente, *Saccharomyces cerevisiae*.

Además, los ejemplos de la levadura incluyen la llamada levadura de sake, la llamada levadura de vino y la llamada levadura de cerveza.

25 Los ejemplos del lisado de levadura (extracto de levadura) incluyen autolisado de levadura generado mediante autólisis de la levadura, levadura cuyas paredes celulares se rompen por contacto con agua caliente y levadura cuyas paredes celulares se rompen mediante enzimas.

En la etapa de cultivo, puede suministrarse un gas que contenga oxígeno al caldo para mantener la respiración de oxígeno de las microalgas. Además, en la etapa de cultivo, puede suministrarse un gas que contenga dióxido de carbono al caldo para promover la fotosíntesis de las microalgas.

Dichos gases pueden suministrarse aireando el caldo o agitando el caldo, por ejemplo.

30 Específicamente, en la etapa de cultivo, el caldo puede airearse, por ejemplo, con aire para suministrar oxígeno para la respiración a las microalgas. Además, en la etapa de cultivo, el caldo puede airearse, por ejemplo, con un gas de escape que contenga una cantidad comparativamente grande de dióxido de carbono para promover la fotosíntesis de las microalgas.

35 En la etapa de cultivo, es preferible que se realicen el cultivo fotoautótrofo y el cultivo heterotrófico al mismo tiempo, mientras se suministran oxígeno y dióxido de carbono en el caldo, por ejemplo, mediante aireación. Es decir, en la etapa de cultivo, es preferible que se realice el cultivo fotoheterotrófico por irradiación con luz y se realice el cultivo heterotrófico en presencia de nutrientes orgánicos, de manera concurrente, mientras se suministra al caldo un gas que contiene tanto oxígeno como dióxido de carbono mediante aireación o similares para promover la respiración de oxígeno y la fotosíntesis de las microalgas.

40 En la etapa de cultivo, la fotosíntesis de las microalgas puede promoverse suministrando dióxido de carbono al caldo, mientras se irradian con luz las microalgas, por ejemplo, durante el día. Además, el cultivo heterotrófico de las microalgas puede realizarse suministrando aire al caldo en presencia de nutrientes orgánicos, por ejemplo, durante la noche, cuando las microalgas no se irradian con luz.

45 Es ventajoso realizar la etapa de cultivo de esta manera porque se promueve adicionalmente el crecimiento de las microalgas y se promueve adicionalmente la producción de paramilo o similares por las microalgas.

La temperatura de cultivo en la etapa de cultivo no está específicamente limitada siempre y cuando las microalgas puedan crecer a esa temperatura. Específicamente, se emplea una temperatura de cultivo (temperatura del caldo), por ejemplo, de 15 °C a 35 °C, preferiblemente de 20 °C a 30 °C.

50 El pH del caldo en la etapa de cultivo no está específicamente limitado siempre y cuando las microalgas puedan crecer a ese pH. Se emplea un pH, por ejemplo, de 2,5 a 5,5.

Para ajustar el pH del caldo, puede añadirse un ácido inorgánico, tal como ácido clorhídrico al caldo, o puede

añadirse un ácido orgánico, tal como ácido acético al caldo. Añadir un ácido orgánico al caldo es ventajoso por que las microalgas pueden crecer usando el ácido orgánico como nutriente orgánico.

Además, para ajustar el pH del caldo, puede añadirse un agente alcalino al caldo. Como el agente alcalino, se usa generalmente hidróxido sódico, hidróxido potásico o similares.

- 5 En la etapa de cultivo, el suministro de oxígeno al caldo puede suprimirse para permitir que las microalgas del género *Euglena* produzcan ésteres cerosos.

Específicamente, las microalgas pueden cultivarse en condiciones anaeróbicas en la etapa de cultivo, por ejemplo, deteniendo la aireación del caldo o suministrando un gas inerte exento de oxígeno o similar al caldo.

- 10 En la etapa de cultivo, las microalgas que tienen polisacáridos almacenados, tales como paramilo en sus células, se cultivan adicionalmente en condiciones anaeróbicas, permitiendo de este modo que las microalgas del género *Euglena* conviertan el paramilo en ésteres cerosos para almacenar los lípidos en sus células.

En la etapa de cultivo, es preferible que las microalgas se cultiven en condiciones anaeróbicas y condiciones de oscuridad sin irradiación de luz, por que la producción de ésteres cerosos puede promoverse adicionalmente.

- 15 Mientras tanto, en la etapa de cultivo, las microalgas pueden cultivarse en presencia de nutrientes inorgánicos que contengan nitrógeno o nutrientes orgánicos que contengan nitrógeno, mientras se suministra oxígeno al caldo, para permitir que las microalgas del género *Euglena* produzcan proteínas.

En la etapa de cultivo, las microalgas se cultivan como se ha descrito anteriormente, permitiendo de este modo que las microalgas produzcan compuestos orgánicos, tales como polisacáridos, lípidos o proteínas mientras crecen las microalgas. Por lo tanto, tales compuestos orgánicos pueden almacenarse en las células de las microalgas.

- 20 Además, en la etapa de cultivo, las condiciones de cultivo se ajustan adecuadamente, permitiendo de este modo que las microalgas produzcan compuestos orgánicos, tales como pigmentos, vitaminas, tales como vitamina C y vitamina E, proteínas y ácidos grasos, incluyendo ácidos grasos saturados, ácidos grasos insaturados avanzados, tales como ácido linoleico, ácido araquidónico y ácido eicosapentaenoico, distintos de los compuestos orgánicos mencionados anteriormente.

- 25 Después, las microalgas que almacenan estos compuestos orgánicos en sus células pueden usarse como biomasa disponible para diversas aplicaciones, tales como alimentos, productos farmacéuticos, pienso, productos químicos y combustible.

Los ejemplos de los polisacáridos incluyen paramilo ( $\beta$ -1,3-glucano). El paramilo se forma uniendo aproximadamente 700 unidades de glucosa.

- 30 Los ejemplos de los lípidos incluyen ésteres cerosos. Los ésteres cerosos se forman mediante enlace de éster entre ácidos grasos superiores y alcoholes superiores. Como los ésteres cerosos, pueden mencionarse ésteres cerosos formados mediante enlace de éster entre un ácido graso C-14 y un alcohol superior C-14.

En el método para producir polisacáridos de esta realización, pueden realizarse las mismas etapas que en el método para producir un compuesto orgánico, que se describirá más adelante.

- 35 Posteriormente, se describe una realización del método para producir un compuesto orgánico de acuerdo con la presente invención.

De acuerdo con el método para producir un compuesto orgánico de esta realización, al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en polisacáridos, lípidos, vitamina C, vitamina E, pigmentos y proteínas se produce como el compuesto orgánico realizando el método de cultivo mencionado anteriormente (etapa de cultivo).

- 40 El método para producir un compuesto orgánico de esta realización tiene un efecto de permitir que se obtenga de un modo suficiente al menos un compuesto orgánico seleccionado entre el grupo que consiste en polisacáridos, lípidos, vitamina C, vitamina E, pigmentos y proteínas.

Entre estos, pueden producirse vitamina C, vitamina E, pigmentos y proteínas junto con polisacáridos realizando el método para producir polisacáridos.

- 45 Preferiblemente, el método para producir un compuesto orgánico de esta realización incluye la etapa de cultivo mencionada anteriormente e incluye adicionalmente una etapa de espesamiento para el aumento de la proporción de las microalgas después de que se cultiven y una etapa de secado para el secado de las microalgas reduciendo adicionalmente la humedad en las microalgas después de la etapa de espesamiento. En el método para producir un compuesto orgánico, la etapa de espesamiento y la etapa de secado no son imprescindibles necesariamente.

- 50 La etapa de espesamiento puede realizarse, por ejemplo, usando un espesante común.

Específicamente, los ejemplos del espesante incluyen un dispositivo que concentra las microalgas aumentando la proporción de las microalgas, por ejemplo, usando espesamiento por flotación, espesamiento por gravedad, espesamiento usando filtración por membrana o espesamiento por bandas. Además, puede usarse un deshidratador como espesante para aumentar adicionalmente la proporción de las microalgas.

- 5 Específicamente, los ejemplos del deshidratador incluyen un deshidratador de vacío, un deshidratador de presión (prensa de filtro), una prensa de bandas, una prensa husillo, un deshidratador centrífugo (decantador de husillo) un deshidratador multidisco.

La etapa de espesamiento puede realizarse usando únicamente el espesante, o puede realizarse usando tanto el espesante como el deshidratador, dependiendo de las aplicaciones que vayan a producirse de los polisacáridos, lípidos, proteínas o similares.

La etapa de secado puede realizarse, por ejemplo, calentando las microalgas después de la etapa de espesamiento o poniendo a presión reducida las microalgas después de la etapa de espesamiento.

Puesto que las microalgas después de la etapa de espesamiento o las microalgas después de la etapa de secado pueden contener al menos uno de polisacáridos, lípidos, vitamina C, vitamina E, pigmentos y proteínas en sus células, pueden usarse según están en aplicaciones tales como alimentos.

Además, al menos uno de polisacáridos, lípidos, vitamina C, vitamina E, pigmentos y proteínas se extrae de las microalgas como un compuesto orgánico sometiendo las microalgas después de la etapa de espesamiento o las microalgas después de la etapa de secado a un proceso de extracción común, según se necesite. El compuesto orgánico extraído puede usarse en aplicaciones, tales como materiales de partida alimentarios y combustible.

Los ejemplos del proceso de extracción que debe emplearse incluyen un proceso de extracción para extraer el compuesto orgánico mencionado anteriormente usando un disolvente orgánico, tal como etanol y hexano, y un proceso de extracción para extraer los lípidos mencionados anteriormente o similares usando un disolvente de CO<sub>2</sub> en un estado subcrítico.

Las microalgas del género *Euglena*, el método para producir polisacáridos y el método para producir un compuesto orgánico de acuerdo con las realizaciones mencionadas anteriormente son como se han ilustrado anteriormente. Sin embargo, la presente invención no se limita a las microalgas del género *Euglena*, el método para producir polisacáridos y el método para producir un compuesto orgánico ilustrados anteriormente.

Además, también es posible emplear diversas realizaciones que se usan comúnmente en microalgas del género *Euglena*, un método para producir polisacáridos, y un método para producir un compuesto orgánico, siempre y cuando no se alteren los efectos de la presente invención.

### **Ejemplos**

A continuación, la presente invención se describe adicionalmente en detalle por medio de ejemplos.

#### Recogida y aislamiento de microalgas del género *Euglena*

Se inoculó agua de lago recogida en lagos y pantanos en Nagasaki en medio de cultivo AF-6 (que se describirá más adelante), que se cultivó durante dos meses a temperatura ambiente mientras se irradiaba con luz fluorescente.

Las microalgas diana en el medio de cultivo después del cultivo se aislaron con una micropipeta. Las microalgas aisladas se cultivaron en el medio de cultivo AF-6 a temperatura ambiente mientras se irradiaban con luz fluorescente.

#### Identificación de microalgas del género *Euglena*

##### 40 Determinación de secuencia de bases

Para confirmar que las microalgas aisladas eran las especies que pertenecen al género *Euglena*, se realizaron las siguientes operaciones.

Es decir, la secuencia de bases del gen 18S ARNr de las microalgas del género *Euglena* cultivadas se determinó mediante un secuenciador de ADN ("CEQ8000", fabricado por Beckman Coulter, Inc.) usando un conjunto de cebador dedicado al gen 18S ARNr de las microalgas del género *Euglena* (Zakrys et al., 2002, Journal of Phycology 38: 1190-1199). La secuencia de bases determinada se muestra como Secuencia N.º 1 en el listado de secuencias.

##### Comparación de secuencia de bases

La secuencia de bases determinada se comparó con la secuencia de bases del gen 18S ARNr de microalgas del género *Euglena* conocidas, obtenidas de GenBank usando la búsqueda por homología BLAST. Además, se hizo una comparación con las microalgas del género *Euglena* conocidas en el grado de coincidencia de homología de

secuencia. La Fig. 1 muestra una tabla de comparación de la secuencia de bases del gen 18S ARNr de las microalgas del género *Euglena* aisladas con la secuencia de bases del gen 18S ARNr de las microalgas del género *Euglena* conocidas.

5 Además, se construyó un árbol filogenético molecular por el método de máxima verosimilitud usando el programa Mega5 de software de representación de árbol filogenético molecular (Tamura et al., 2011, Mol. Biol. Evol. 28: 2731-2739). La Fig. 2 muestra el árbol filogenético.

10 Como resultado, se identificó que las microalgas aisladas de la manera anterior eran las especies pertenecientes al género *Euglena* (*Euglena gracilis* Klebs). Debe indicarse que Ka, Kb, Na y Nb de la cepa EOD-1 en la Fig. 2 son símbolos que denotan muestras de ensayo de las microalgas aisladas. Se obtuvo el mismo resultado al usar cualquier muestra de ensayo.

Análisis RAPD

15 Además, para comparación de las microalgas del género *Euglena* aisladas con las microalgas del género *Euglena* conocidas, se obtuvieron el patrón de bandas de las microalgas del género *Euglena* aisladas y los patrones de bandas de 6 cepas del Instituto Nacional para Estudios Ambientales mediante análisis RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar) (Literatura de referencia: Williams et al., (1990) Nucleic Aids Res. 18 (22), 6531-6535).

Las condiciones de PCR en el análisis RAPD fueron como se indican a continuación.

20 Número de muestra: 3  
 Cebador 1: AAATCGGGCTG: RAPD-6, Secuencia N.º 2  
 Enzima: Ex Taq (fabricada por Takara Bio Inc.)  
 Tampón de reacción: 50 µl  
 Cantidad patrón de ADN: aproximadamente 0,5 ng  
 Condiciones de temperatura para PCR: como se muestra en la Tabla 1; específicamente, después de un tratamiento a 94 °C durante un minuto, se repitió 35 veces un conjunto de tratamientos (94 °C durante un minuto, 40 °C durante 45 segundos y 72 °C durante un minuto), seguido de un tratamiento a 72 °C durante 7 minutos.  
 25 Condiciones de electroforesis: gel de agarosa al 2,5 % en masa, 100 V, 40 minutos

Tabla 1

Funcionamiento cíclico de PCR	Temperatura (°C)	Tiempo	
Desnaturalización	94	1 minuto	
Desnaturalización	94	1 minuto	Repetido 35 veces
Emparejamiento	40	45 segundos	
Elongación	72	1 minuto	
Elongación	72	7 minuto	

Cepas comparadas en análisis RAPD

30 NIES-47 de *Euglena gracilis*  
 NIES-48 de *Euglena gracilis*  
 NIES-49 de *Euglena gracilis*  
 NIES-253 de *Euglena gracilis*  
 NIES-286 de *Euglena gracilis*  
 NIES-2149 de *Euglena gracilis*

35 Además, aunque cambiando el cebador, el análisis RAPD se realizó de la misma manera por la PCR.

Cebador 2: ATCGGGTCCG: RAPD-4, Secuencia N.º 3  
 Cebador 3: GCGATCCCA: RAPD-3, Secuencia N.º 4

La secuencia de bases de los cebadores 2 a 4 mencionados anteriormente se describen en Mostafa et al., (2011) Molecules 16, 2598-2608.

40 La Fig. 3A muestra los resultados (patrones de bandas) del análisis RAPD usando el cebador 1 mencionado anteriormente. Además, la Fig. 3B y la Fig. 3C muestran los resultados del análisis RAPD usando respectivamente los cebadores 2 y 3 mencionados anteriormente. Cabe destacar que Ka y Na de la cepa EOD-1 en la Fig. 3A a la Fig. 3C corresponden respectivamente a Ka y Na en la Fig. 2.

A partir de los resultados del análisis RAPD, se ha descubierto que los patrones de bandas de las microalgas del género *Euglena* aisladas de la manera anterior son diferentes de los patrones de bandas de las microalgas del género *Euglena* conocidas. Por consiguiente, se ha determinado que las cepas de las microalgas del género *Euglena* aisladas de la manera anterior son diferentes de aquellas de las microalgas del género *Euglena* conocidas.

- 5 Entonces, las microalgas del género *Euglena* aisladas de la manera anterior se nombraron cepa EOD-1 de *Euglena gracilis*.

Cultivo de microalgas del género *Euglena*

Para cultivar las microalgas del género *Euglena*, se prepararon los siguientes materiales y se sometieron a una etapa de cultivo en las siguientes condiciones de cultivo.

- 10 Cepas de microalgas del género *Euglena* de la presente invención: Cepa EOD-1 de microalgas del género *Euglena* (*Euglena gracilis*) (N.º de acceso: FERM BP-11530) (depositada en el Organismo Depositario de Patentes en el Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación)  
 Cepas de microalgas conocidas del género *Euglena*: Cepa NIES-48 de microalgas del género *Euglena* (*Euglena n*)
- 15 Recipiente de cultivo: como se describe a continuación, tal como un matraz de 300 a 500 ml  
 Suministro de gas al caldo: agitación a 130 rpm; se suministra aire al caldo agitando el caldo.  
 Temperatura de cultivo: 28 °C  
 Periodo de cultivo: como se describe a continuación  
 pH del caldo: como se describe a continuación
- 20 Componentes en caldo para cultivo: Las composiciones mostradas en la Tabla 2 y la Tabla 3 se emplearon como composiciones básicas.

- 25 La composición mostrada en la Tabla 2 se obtuvo añadiendo componentes de la composición de medio de cultivo "P IV metals" (desvelado por la Colección de Cultivos Microbianos en el Instituto Nacional para Estudios Ambientales) a la composición de "medio de cultivo AF-6 " desvelada por la Colección de Cultivos Microbianos en el Instituto Nacional para Estudios Ambientales. Además, el componente distinto a los nutrientes contenidos en el caldo fue agua.

Además, la composición mostrada en la Tabla 3 se basó en la composición de medio de cultivo Cramer-Myers.

Tabla 2

	Composición basada en medio de cultivo AF-6
NaNO <sub>3</sub>	140 mg/l
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	22 mg/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 mg/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5 mg/l
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	30 mg/l
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	10 mg/l
Citrato férrico	2 mg/l
Ácido cítrico	2 mg/l
Biotina	2 µg/l
Tiamina HCl	10 µg/l
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,98 mg/l
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	5 mg/l
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,18 mg/l
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,02 mg/l
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,11 mg/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,0125 mg/l

(continuación)

	Composición basada en medio de cultivo AF-6
MES	400 mg/l
Vitamina B <sub>6</sub>	1 µg/l
Vitamina B <sub>12</sub>	1 µg/l

Tabla 3

	Composición basada en medio de cultivo Cramer-Myers
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	500 mg/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	500 mg/l
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	200 mg/l
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	20 mg/l
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ·7H <sub>2</sub> O	3 mg/l
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1,8 mg/l
CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,5 mg/l
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,4 mg/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,2 mg/l
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,02 mg/l
Vitamina B <sub>1</sub>	0,1 mg/l
Vitamina B <sub>12</sub>	1 µg/l

- 5 Peso inicial de microalgas antes del cultivo: 0,78 g/l (peso seco)

Nutrientes orgánicos: los siguientes materiales se cambiaron adecuadamente dependiendo del cultivo.

- Glucosa
  - Extracto de levadura (autolisado de levadura): "Dried Yeast Extract D-3" (nombre del producto), fabricado por NIHON PHARMACEUTICAL CO., LTD.
- 10 • Cerveza como una bebida fermentada: Cerveza disponible en el mercado (con una proporción de uso de malta del 66,7 % o superior) que contiene un 5 % en volumen de etanol

En los Ejemplos 1 a 4 y los Ejemplos Comparativos 1 a 4, el cultivo heterotrófico se realizó en condiciones de oscuridad y el cultivo fotoheterotrófico se realizó en los otros ejemplos y ejemplos comparativos. Las condiciones de cultivo en el cultivo fotoheterotrófico de microalgas se muestran en detalle más adelante.

- 15 Condiciones de fotoirradiación: después de fotoirradiación durante 12 horas, puesto en la oscuridad durante 12 horas

Intensidad de luz: densidad de flujo fotónico fotosintético (PPFD) de aproximadamente 100 µmol/m<sup>2</sup>·s o aproximadamente 200 µmol/m<sup>2</sup>·s

### Ejemplo 1

- 20 Se pusieron 200 ml de la composición mostrada en la Tabla 2 en un matraz Sakaguchi de 500 ml. Además, se le añadieron glucosa y extracto de levadura a una concentración de glucosa de 15 g/l y una concentración de extracto de levadura de 5 g/l. Además, el pH se ajustó a 4,0 mediante la adición de ácido clorhídrico. De este modo, se preparó un caldo.

Después, el matraz se agitó en las condiciones de cultivo mencionadas anteriormente y condiciones de oscuridad (es decir, en condiciones de cultivo heterotrófico) y la cepa EOD-1 de microalgas del género *Euglena* (*Euglena gracilis*) se cultivó durante 3 días. Así se realizó la etapa de cultivo.

#### Ejemplos 2 a 4

- 5 La etapa de cultivo se realizó de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto porque se cambió la cantidad de glucosa de modo que la concentración de glucosa en el caldo fue 20 g/l, 25 g/l y 30 g/l, respectivamente.

#### Ejemplo Comparativo 1

- 10 La etapa de cultivo se realizó de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto porque la cepa NIES-48 de microalgas del género *Euglena* (*Euglena gracilis*) se cultivó durante 5 días en lugar de la cepa EOD-1 de microalgas del género *Euglena* (*Euglena gracilis*).

#### Ejemplos Comparativos 2 a 4

La etapa de cultivo se realizó de la misma manera que en el Ejemplo Comparativo 1, excepto porque se cambió la cantidad de glucosa de modo que la concentración de glucosa en el caldo fue 20 g/l, 25 g/l y 30 g/l, respectivamente.

- 15 Se midió el peso seco de las microalgas después de la etapa de cultivo en cada uno de los ejemplos y los ejemplos comparativos. Además, se determinó la tasa de conversión de los nutrientes añadidos mediante la siguiente fórmula de cálculo.

Tasa de conversión (%) = Peso seco (g/l) de algas aumentado por cultivo/Concentración (g/l) de glucosa consumida

La Fig. 4 muestra los resultados de la tasa de conversión y el peso seco de las algas después del cultivo en cada uno de los ejemplos y los ejemplos comparativos

- 20 Como se observa a partir de la Fig. 4, la cepa EOD-1 de microalgas del género *Euglena* (*Euglena gracilis*) tiene una producción de biomasa superior a la de la cepa NIES-48 conocida.

#### Ejemplo 5

- 25 La etapa de cultivo se realizó cultivando la cepa EOD-1 de microalgas del género *Euglena* (*Euglena gracilis*) de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto porque se usó un matraz Erlenmeyer de 300 ml, se usó un caldo obtenido añadiendo cerveza a 50 ml de la composición mostrada en la Tabla 2 a una concentración de etanol derivado de la cerveza de 2,5 % en volumen, no se añadió el extracto de levadura al caldo, se repitieron el entorno de fotirradiación durante 12 horas y el entorno de oscuridad durante 12 horas durante el cultivo y el periodo de cultivo fue de 7 días. La densidad de flujo fotónico fotosintético (PPFD) se ajustó a aproximadamente 100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ .

#### Ejemplo 6

- 30 La etapa de cultivo se realizó de la misma manera que en el Ejemplo 5, excepto porque el extracto de levadura se añadió al caldo a una concentración de extracto de levadura de 2 g/l.

#### Ejemplo Comparativo 5

La etapa de cultivo se realizó de la misma manera que en el Ejemplo 5, excepto porque se cultivó la cepa NIES-48 de microalgas del género *Euglena* en lugar de la cepa EOD-1 de microalgas del género *Euglena* (*Euglena gracilis*).

- 35 Ejemplo Comparativo 6

La etapa de cultivo se realizó de la misma manera que en el Ejemplo Comparativo 5, excepto porque el extracto de levadura se añadió al caldo a una concentración de extracto de levadura de 2 g/l.

En la etapa de cultivo de cada uno de los Ejemplos 5 y 6 y los Ejemplos Comparativos 5 y 6, se midió el peso seco de microalgas después de cultivo durante 1, 2, 3, 4, 5 y 7 días. La Fig. 5 muestra los resultados.

- 40 Como se observa a partir de la Fig. 5, la cepa EOD-1 de microalgas del género *Euglena* (*Euglena gracilis*) tiene una productividad mayor que la cepa NIES-48 conocida, incluso cuando se cultivan en condiciones de cultivo fotoheterotrófico.

#### Ejemplos 7 a 12

- 45 La etapa de cultivo se realizó de la misma manera que en el Ejemplo 5, excepto porque se usó la composición mostrada en la Tabla 3 en lugar de la composición mostrada en la Tabla 2, el pH inicial del caldo se cambió a pH 5,5, pH 6,0, pH 7,0, pH 8,0, pH 8,5 y pH 9,0, respectivamente, y el periodo de cultivo se cambió a 10 días.

En la etapa de cultivo de cada uno de los Ejemplos 7 a 12, se midió el peso seco de las microalgas después del

cultivo a lo largo del tiempo. La Fig. 6 muestra los resultados.

#### Ejemplos 13 a 17

5 La etapa de cultivo se realizó de la misma manera que en el Ejemplo 5, excepto porque se usó la composición mostrada en la Tabla 3 en lugar de la composición mostrada en la Tabla 2, la densidad de flujo fotónico fotosintético (PPFD) se ajustó a aproximadamente 200  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ , el pH inicial del caldo se cambió a pH 3,5, pH 4,0, pH 4,5, pH 5,0 y pH 5,5, respectivamente, y el periodo de cultivo se cambió a 10 días.

#### Ejemplos 18 y 19

10 La etapa de cultivo se realizó de la misma manera que en el Ejemplo 5, excepto porque se usó la composición mostrada en la Tabla 3 en lugar de la composición mostrada en la Tabla 2, el pH inicial del caldo se cambió a pH 3,5 y pH 5,5, respectivamente, y el periodo de cultivo se cambió a 10 días.

En la etapa de cultivo de cada uno de los Ejemplos 13 a 19, se midió el peso seco de las microalgas después del cultivo a lo largo del tiempo. La Fig. 7 muestra los resultados.

#### Ejemplo 20

15 La etapa de cultivo se realizó cultivando la cepa EOD-1 de microalgas del género *Euglena* (*Euglena gracilis*) de la misma manera que en el Ejemplo 5, excepto porque el periodo de cultivo fue de 7 días.

El cultivo se realizó en condiciones aeróbicas agitando el matraz hasta dos días después del inicio del cultivo. Después de esto, se detuvo la agitación y el cultivo se realizó en condiciones anaeróbicas suministrando un gas inerte (gas de nitrógeno).

#### Ejemplo Comparativo 7

20 La etapa de cultivo se realizó de la misma manera que en el Ejemplo 20, excepto porque la cepa NIES-48 de microalgas del género *Euglena* (*Euglena gracilis*) se cultivó en lugar de la cepa EOD-1 de microalgas del género *Euglena* (*Euglena gracilis*).

25 El cultivo se realizó en condiciones aeróbicas agitando el matraz hasta 4 días después del inicio del cultivo. Después de esto, se detuvo la agitación y el cultivo se realizó en condiciones anaeróbicas suministrando un gas inerte (gas de nitrógeno).

Se midieron cada día las cantidades de paramilo y lípidos (ésteres cerosos) producidas por el cultivo en el Ejemplo 20 y Ejemplo Comparativo 7.

30 La cantidad de paramilo después del cultivo se midió por el siguiente procedimiento. Esto es, se puso una mezcla (40 ml) del caldo y las microalgas después del cultivo en un tubo centrífugo, seguido de centrifugación. Se añadió agua pura al precipitado después de la centrifugación para producir una suspensión y se repitió dos veces la operación de reseparación centrífuga. Después, se añadió una pequeña cantidad de agua pura al precipitado después de la centrifugación para producir una suspensión, y los sólidos suspendidos se criodesecharon. De este modo, se retiraron los componentes del caldo.

35 Después, se pesaron con precisión aproximadamente 400 mg de las células de las microalgas criodesechadas en un tubo centrífugo (que se había pesado como un valor en blanco). Se le añadió acetona para producir una suspensión y el fluido sobrenadante después de la centrifugación se retiró. La operación de lavado con acetona se repitió aproximadamente 5 veces hasta que desapareció el color del fluido sobrenadante. De este modo, se retiraron los componentes pigmentarios producidos por las microalgas.

40 Posteriormente, usando una solución de dodecil sulfato sódico, se realizó una operación para retirar componentes distintos al paramilo. Es decir, se añadieron 20 ml de una solución al 1 % de dodecil sulfato sódico (SDS) al residuo después de haber retirado los componentes pigmentarios para producir una suspensión, que tras esto se calentó a 100 °C durante 10 minutos. Después, se retiró el fluido sobrenadante tras centrifugación. Dicha operación se repitió dos veces y después se repitió tres veces la misma operación usando agua pura en lugar de la solución de SDS. De este modo, se retiró por lavado el SDS.

45 Finalmente, todo el tubo centrífugo se puso en un en una secadora a 105 °C por lo que se retiró la humedad, y se midió el peso del tubo centrífugo que contenía paramilo. Después, se determinó la cantidad de paramilo mediante la diferencia con el valor en blanco mencionado anteriormente.

Al mismo tiempo, se midió la cantidad de ésteres cerosos después del cultivo por el método BLIGHT-DYER.

50 La Fig. 8A y la Fig. 8B muestran los resultados de medición de la cantidad de paramilo a lo largo del tiempo en el cultivo del Ejemplo 20 y el Ejemplo Comparativo 7. Además, la Fig. 9A y la Fig. 9B muestran los resultados de medición de la cantidad de lípido (éster ceroso) a lo largo del tiempo.

Como se observa a partir de la Fig. 8A y la Fig. 8B, la cepa EOD-1 de microalgas del género *Euglena* (*Euglena gracilis*) tiene una velocidad de producción de paramilo superior a la de la cepa NIES-48 de microalgas del género *Euglena* (*Euglena gracilis*) convencionales. Además, la cepa EOD-1 tiene un contenido de paramilo por célula de aproximadamente 55 % o más, que es superior al de la cepa NIES-48.

- 5 Además, como se observa a partir de la Fig. 9A y la Fig. 9B, la cepa EOD-1 de microalgas del género *Euglena* (*Euglena gracilis*) tiene una velocidad de producción de lípidos superior (éster ceroso), y por ello se aumenta el contenido de ésteres cerosos por célula dentro de un periodo más corto.

Además, la etapa de cultivo se realizó usando el medio de cultivo que tiene la composición mostrada más adelante en la Tabla 4 y la Tabla 5 en las siguientes condiciones de cultivo.

10 **Ejemplo 21**

Las microalgas mencionadas anteriormente, cepa EOD-1, se cultivaron durante dos días mediante cultivo fotoheterotrófico.

Ejemplo Comparativo 8

- 15 Las microalgas mencionadas anteriormente, cepa NIES-48, se cultivaron durante dos días mediante cultivo fotoheterotrófico.

Como medio de cultivo, se empleó un medio de cultivo obtenido añadiendo 30 g/l de glucosa a un medio de cultivo Hutner modificado (en lo sucesivo en el presente documento, denominado "medio de cultivo Hutner modificado"). Específicamente, la composición fue como se muestra en la Tabla 4 y el componente en el líquido distinto de los nutrientes fue agua. Como la solución traza de metal en la Tabla 4, se usó una solución traza de metal que tiene la composición de la Tabla 5. El componente distinto del metal traza fue agua.

20

El método de cultivo detallado fue de la siguiente manera.

Caldo: con un pH ajustado a 4,0 usando ácido clorhídrico

Recipiente de cultivo: matraz Sakaguchi de 500 ml

- 25 Introducción antes del cultivo: se pusieron 200 ml del caldo y las microalgas antes del cultivo el matraz Sakaguchi (para ajustar la cantidad inicial de biomasa, se usaron 220 ml en total para la cepa EOD-1 y se usaron 236 ml en total para la cepa NIES-48).

Temperatura durante el cultivo: 28 °C

Condiciones de luz-oscuridad durante el cultivo: cultivado en condiciones de oscuridad protegidas de la luz

- 30 Condiciones aeróbicas durante el cultivo: El matraz Sakaguchi se puso en un agitador y se suministró aire en el caldo haciendo funcionar el agitador con agitación recíproca a 130 rpm.

Tabla 4

Medio de cultivo Hutner modificado: Glucosa Añadida	
Glucosa	30 g/l
Asparagina	2 g/l
Ácido glutámico	5 g/l
Ácido málico	5 g/l
Glicina	2,5 g/l
Urea	0,4 g/l
Ácido succínico	0,1 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,4 g/l
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,14 g/l
MgCO <sub>3</sub>	0,4 g/l

(continuación)

Medio de cultivo Hutner modificado: Glucosa Añadida	
CaCO <sub>3</sub>	0,1 g/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,021 g/l
Vitamina B <sub>1</sub>	0,6 mg/l
Vitamina B <sub>12</sub>	0,05 mg/l
Solución de metal traza	10 ml/l

Tabla 5

ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,1 g/l
MgSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,58 g/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,18 g/l
CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,024 g/l
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,077 g/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,029 g/l
NaNO <sub>3</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,074 g/l

- 5 El peso seco (producción de biomasa) de las algas después de dos días desde el cultivo y la conversión de glucosa se calcularon de la misma manera que antes. La Tabla 6 muestra los resultados.

Tabla 6

Después de dos días desde el cultivo	Ej. 21 (Cepa EOD-1)	Ej. C. 8 (Cepa NIES-48)
Peso seco (g/l)	24,50	11,50
Conversión de glucosa (%)	76	33

- 10 Como se observa a partir de la Tabla 6, la cepa EOD-1 de microalgas del género *Euglena* (*Euglena gracilis*) tiene un rendimiento de producción de biomasa mejor y una mejor conversión de glucosa que la cepa NIES-48 de microalgas del género *Euglena* (*Euglena gracilis*) convencional.

**Aplicabilidad industrial**

- 15 Las microalgas de la presente invención, el método para producir polisacáridos de la presente invención y el método para producir un compuesto orgánico de la presente invención se usan adecuadamente para obtener compuestos orgánicos tales como polisacáridos, tales como paramilo, lípidos, tales como ésteres cerosos, y proteínas mediante cultivo.

- 20 Los compuestos orgánicos obtenidos pueden usarse en aplicaciones, tales como alimentos saludables, productos farmacéuticos, pienso, productos químicos o combustible, mientras permanecen almacenados en las células de las microalgas, o después de haberse extraído por un proceso de extracción o similar. Específicamente, los lípidos almacenados en las células de las microalgas como compuestos orgánicos mediante cultivo se usan adecuadamente, por ejemplo, como material de partida de combustible mediante su extracción desde las células.

LISTA DE SECUENCIAS

- 25 <110> University of Tsukuba Kobelco Eco-Solutions Co.,LTD.

<120>

\203\206\201[\2030\203\214\203i\221@224+215x\221\224\227p\201A\221\223\234

ES 2 729 837 T3

\227p\202\220»\221ϕ\2250\226@\201A\213y\202N\227L\213@\211»\215\207\225~\202  
 \220»\221ϕ\2250\226@

5  
  
10  
  
15

- <130> FPP-4864
- <150> JP 2013-067558
- <151> 27-03-2013
- <160> 4
- <210> 1
- <211> 1960
- <212> ADN
- <213> *Euglena gracilis*
- <400> 1

```

gtgtgctcgg tccacctgca aggaccccat tggacatcca ccaaaacctt gtggttaata      60
cacgttcgac ccagtcagcc atgcaacact cggcagggat cctgtcttcg gacagtcacct      120
tcaccgggtgg tggcggatgt atgccagct gatataaaga ccagcggccg caaggccagt      180
gtgttggcat ggttgactca ggctggccct ccgtggcccg tgtgctggtg gatttcgtgc      240
atgcctcgtg tatgccccac ttgatcgcaa gagcttctga cctatcagct tgactgtggt      300
gtatcggacc acagtggcct tgacgggtaa cggagaatca gggttcgatt ccggagaggg      360
agcctgagag acggctacca ctaccaaggt gggcagcagg cacgcaaatt gccccatgca      420
aagacagtct gtgaggcagc gacgaacagt agcaaccccg tcggccttac gtgccgatgg      480
ggcttggaaat ggacgctatc caaagacagc cgtgagatc aaccggaggg caagtctggt      540
gccagcagct gcggtaatc cagctccgag ggcgtatact aacattgctg ctgttaaac      600
actttagtc tgcctacggg ctgcaggtct gctgggtggc cggtttgtt tttctctggc      660
caggaagga cctcggttcg accctgtgtt gggctgcaac ggctggactc aacccccagt      720
ggtacgtccc tgcgccacc tttcagtoga tggtagatc tgctcctgcc aaaagtctgc      780
ttcattgcag gccaaagcgg tttatgcctc ccgcaactgg aacggacacc aacaggggac      840
ccagcctoga gctgggtagt ctacctctgg tccaccaccg gagcccaccg tcttcgacac      900
cctggaaaac tcagtgtgct caaagcatcc ccgcgacggc tgaatgtcca tccatggaat      960
gtcaaggcat cgaccaagtg tggcattgga gttgtgctgg ccttggggcc cactctggac     1020
aacctggtgg tgtgttcctg caggatcaac aggatcgttg ccctgcctgg ccttcggggtc     1080
tcgtcaggct tcgtcccctg tccctgcagc ttgcacccat cgatcgtaag tgatgggact     1140
gttcgggggtg aaagatacgg gagcgcaga ggtgaaattc ttagatcgct gccagatcca     1200
ctgcagcgaa ggcgttctgc aagtgcacgt ccgtcgatca agaatgagag ttcgggggagc     1260
aaagatgatc agacaccgtc gtagtccggc cactgtaaac gatgccggcc aggccttggc     1320
agagcaagaa tccgagactc tgtcagggcc actcctccca caacgagaaa tccacagcct     1380
gtgggttcag gggggagtac tgtcgcaagg ctgaaactta aaggaattga cggaatggca     1440
ccacaaggcg tggagtatgc ggcttaattt gactcaacgc ggggaatgtt accaggtcag     1500
gacgcaactg ggattgacag attgagagct cttcttgat cttgtggacg gtggtgcatg     1560
gccgctcctg attggtggag tgatttgtct ggttgattcc gataacgagt gagacatctg     1620
cctcccacta gcctggggct cgcatttggg aggttccggc tgctcgggtg cagccccctg     1680
gcaacagggg gagatgtacc ggtgcatgct cccgagagcc tccagttcag cttctctgag     1740
gtgctgtgtc cgccacaaag ggcacgcatg ctagagccaa cagcaggtct gtgatgctcc     1800
cagatgtcct gggccgcacg cgcactacat tgtcacagtg aaggtgtcga catgccact     1860
ccggtgggccc ctggcctgaa gaggctggga aatcctgcaa gcctgtgacg tactggggat     1920
agatggttgc aactgtctgc cttgaacgtg gaatgcctag                               1960
  
```

20  
  
25  
  
30

- <210> 2
- <211> 11
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Una secuencia para cebador 1
- <400> 2
- aaatcgggct g**
- <210> 3
- <211> 10
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Una secuencia para cebador 2

<400> 3

**atcgggtccg**

**10**

5

<210> 4

<211> 10

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Una secuencia para cebador 3

<400> 4

**gcgatcccca**

**10**

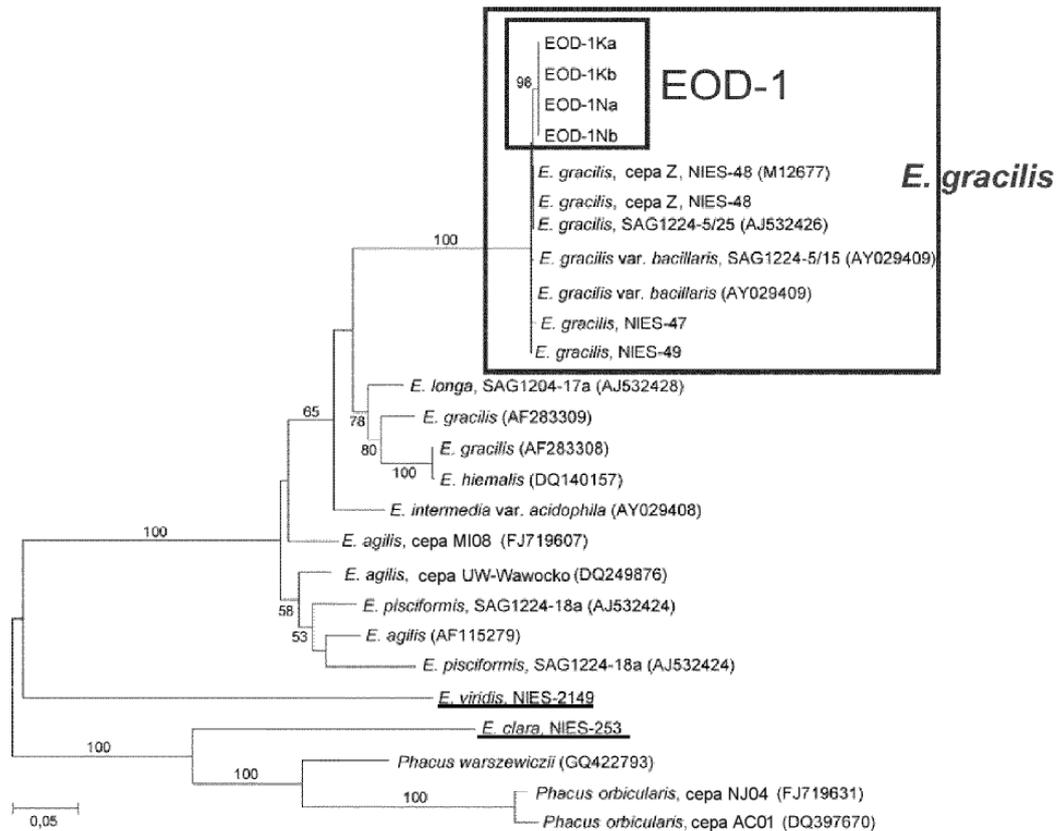
**REIVINDICACIONES**

1. Microalgas del género *Euglena* que entran dentro de la cepa EOD-1 de *Euglena gracilis* (N.º de acceso FERM BP-11530) y que son capaces de producir al menos polisacáridos.
- 5 2. Un método para producir polisacáridos que comprende:  
cultivar las microalgas del género *Euglena* de acuerdo con la reivindicación 1 como organismos productores de polisacáridos para producir los polisacáridos.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que un caldo usado en el cultivo contiene de 15 a 30 g/l de glucosa.
- 10 4. El método de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, en el que el caldo usado en el cultivo contiene lisado de levadura.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que los polisacáridos son paramilo.
- 15 6. Un método para producir un compuesto orgánico que comprende:  
cultivar las microalgas del género *Euglena* de acuerdo con la reivindicación 1 para producir al menos un compuesto orgánico seleccionado entre el grupo que consiste en polisacáridos, lípidos, vitamina C, vitamina E, pigmentos y proteínas.

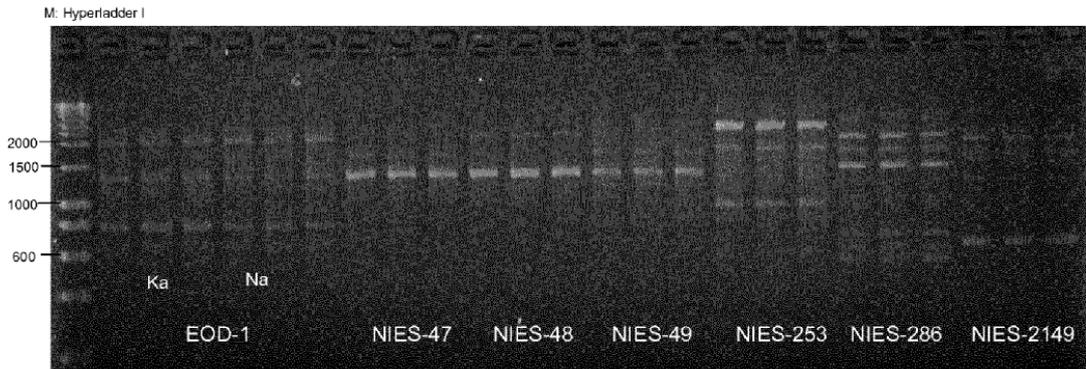
Fig. 1

Secuencia N.º (1960 en total)	93	94	108	156	221	251	396	742	785	852	1000	1334	1439	1440	1460	1636	1765	1779
EOD-1	G	C	T	A	T	T	-	T	T	C	G	G	C	A	C	G	C	A
NIES-47	T	G	C	G	A	C	-	C	T	T	G	T	C	A	C	A	T	C
NIES-48(Z)	G	C	C	G	A	C	-	C	C	C	G	T	C	A	C	A	T	A
NIES-48(Z M12677)	G	C	C	G	A	C	-	C	C	C	-	T	C	A	C	A	T	A
NIES-49	G	C	C	G	A	C	-	C	T	T	G	T	C	A	C	A	T	A
SAG1224-5/15	G	C	C	G	A	C	-	C	T	T	G	T	G	C	G	A	T	A
SAG1224-5/25	G	C	C	G	A	C	-	C	C	C	G	T	C	A	C	A	T	A
AY029409	G	C	C	G	A	C	A	C	T	T	G	T	C	A	C	A	T	A

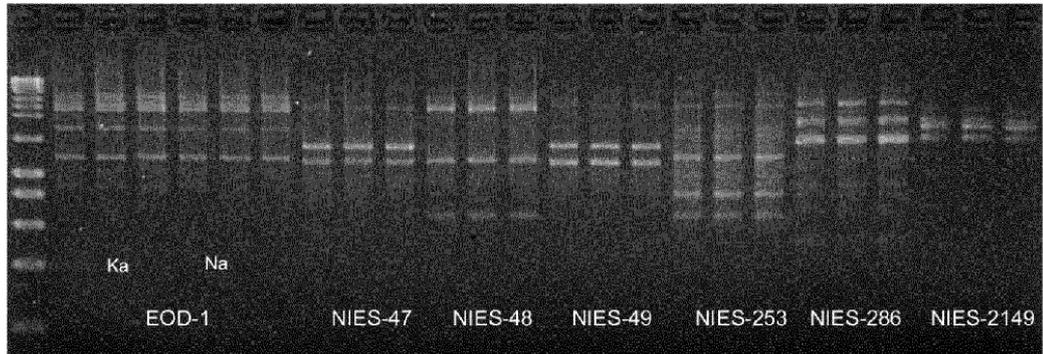
Fig. 2



**F i g . 3 A**



**F i g . 3 B**



**F i g . 3 C**

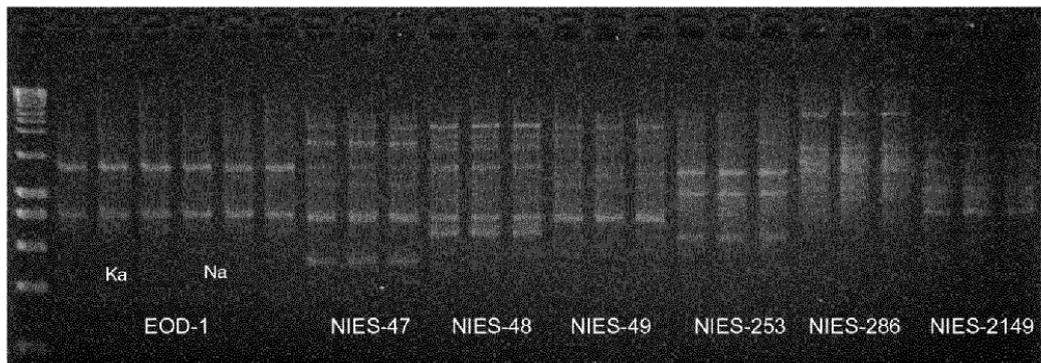


Fig. 4

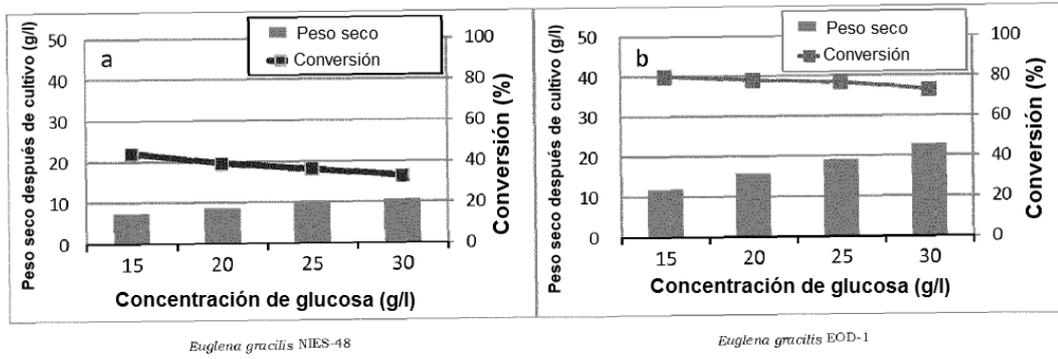


Fig. 5

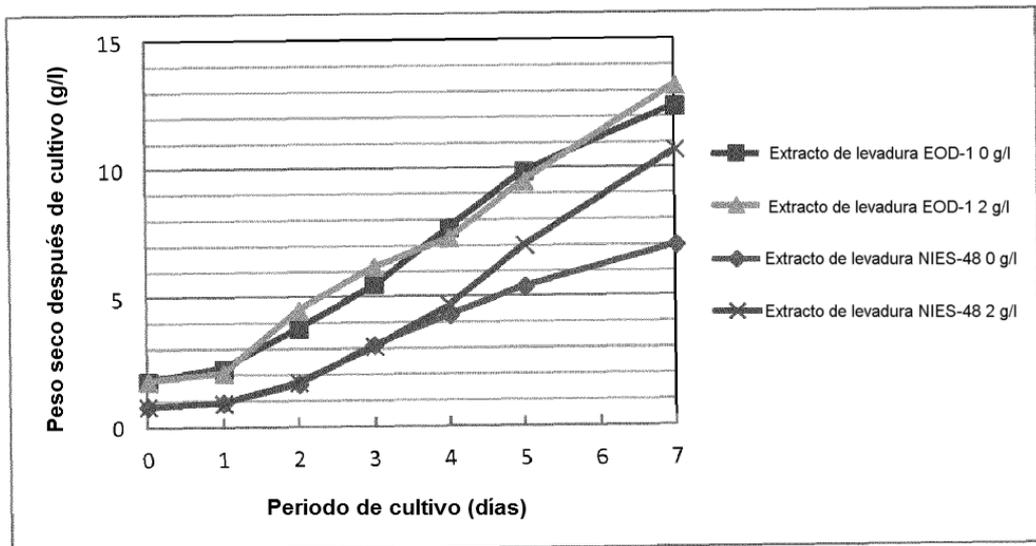


Fig. 6

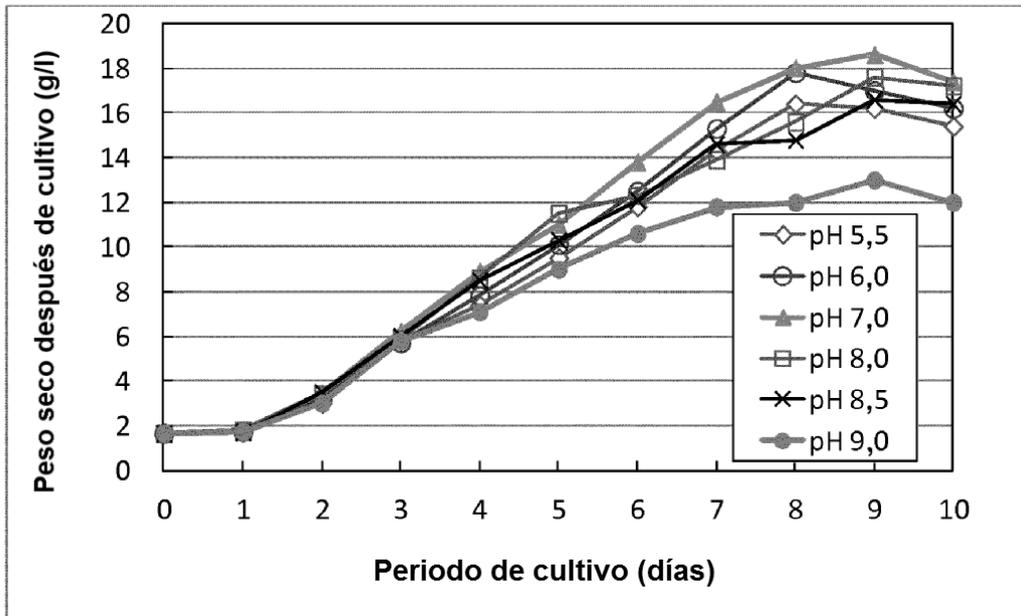


Fig. 7

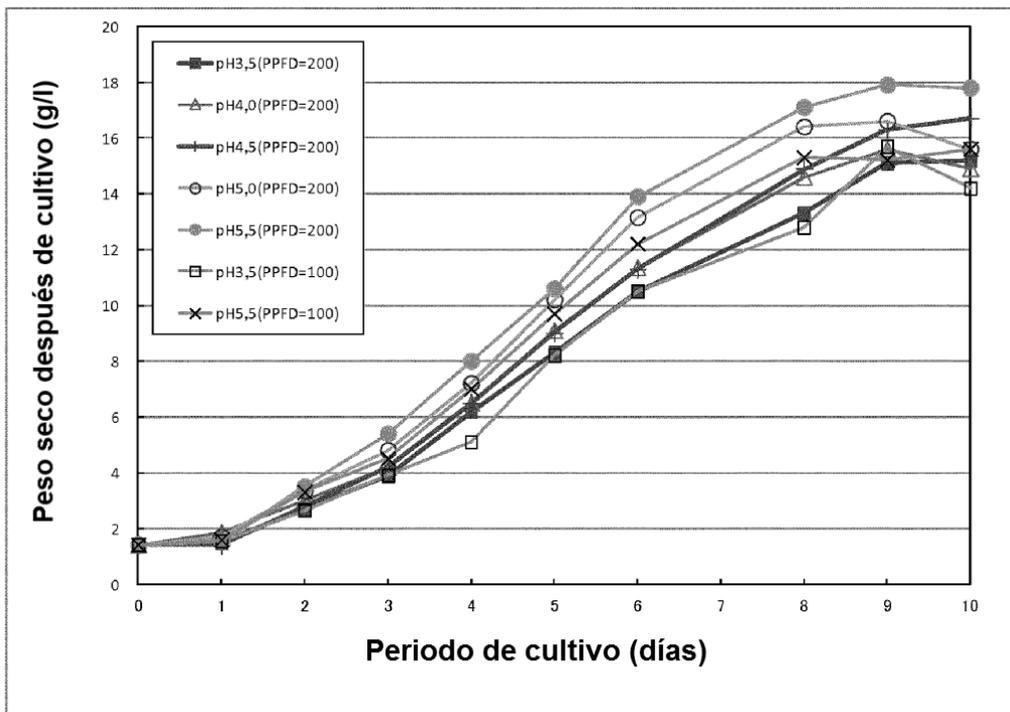


Fig. 8A

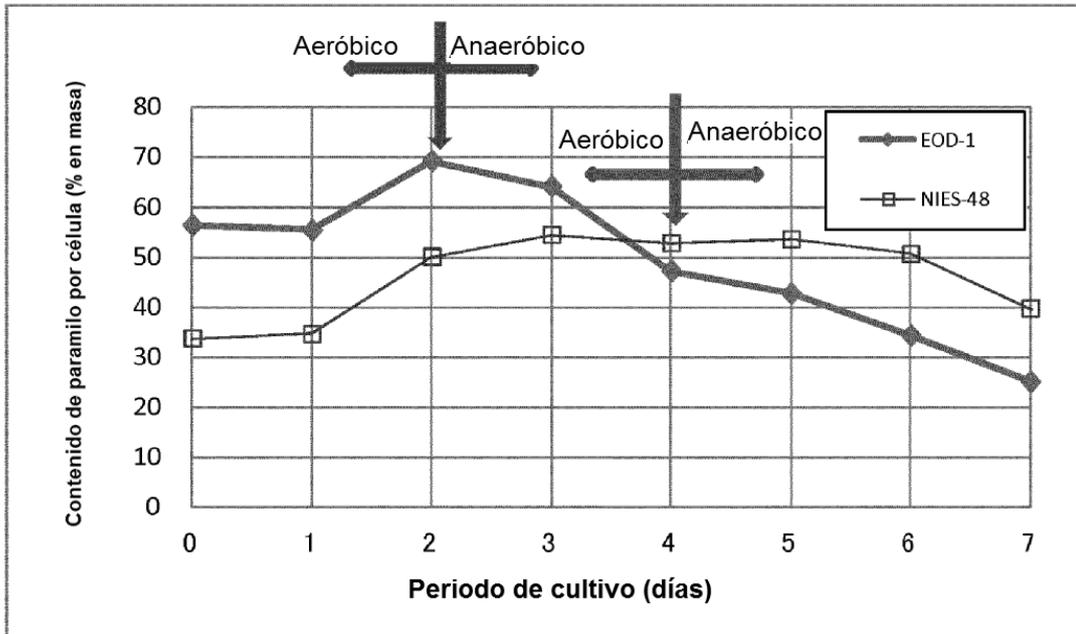


Fig. 8B

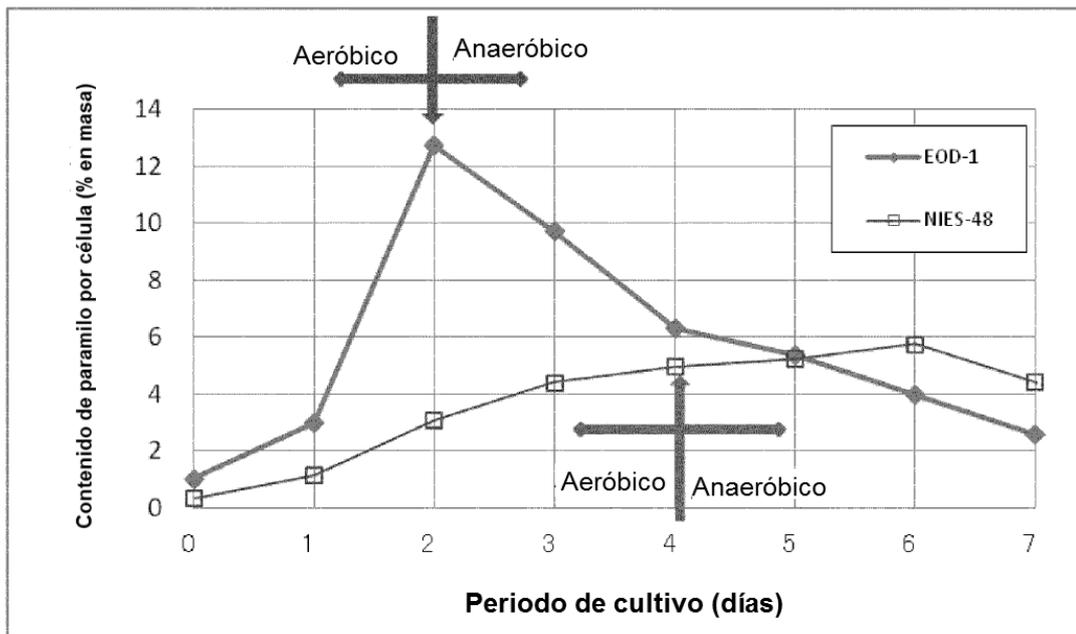


Fig. 9A

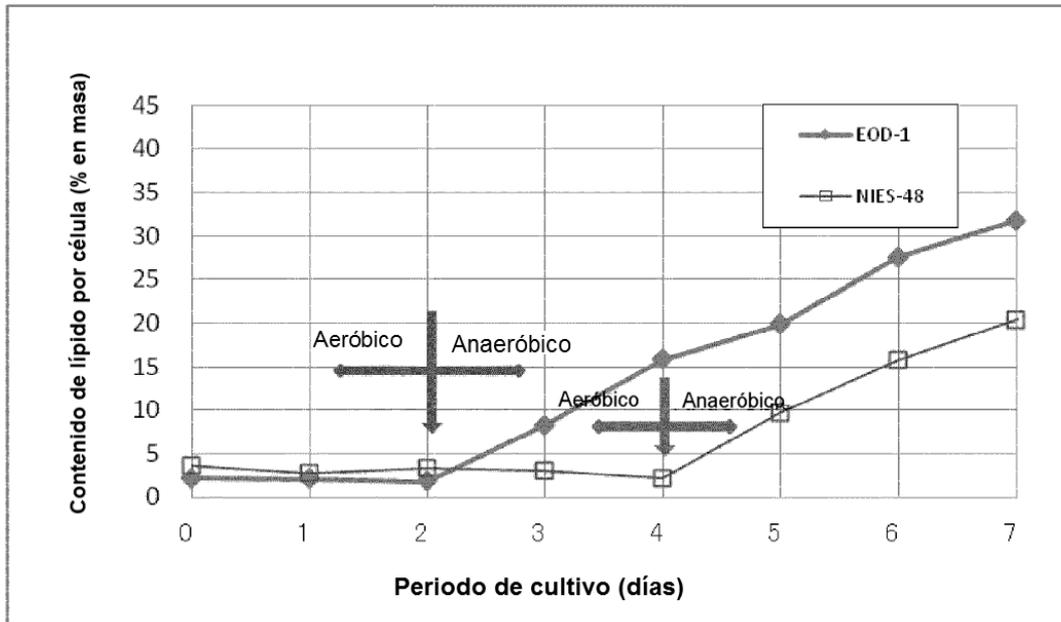


Fig. 9B

