

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 134**

51 Int. Cl.:

C12P 7/64 (2006.01)

C12R 1/89 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.06.2011 PCT/NZ2011/000100**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.12.2011 WO11155852**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2011 E 11792727 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2019 EP 2580342**

54 Título: **Composiciones que comprenden ácido eicosapentaenoico adecuado para una alta purificación**

30 Prioridad:

29.10.2010 NZ 58891410

09.06.2010 NZ 58601810

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

27.11.2019

73 Titular/es:

FERMENTALG (100.0%)

4 rue Rivière

33500 Libourne, FR

72 Inventor/es:

GRIFFITHS, HYWEL, DAVID;

GEIRINGER, KARL, THOMAS y

DINES, MARK, HUMPHREY

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 733 134 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

Composiciones que comprenden ácido eicosapentaenoico adecuado para una alta purificación

Campo de la invención

- 5 El campo de esta invención se refiere a composiciones que contienen ácido eicosapentaenoico que son adecuadas para la concentración y purificación para uso farmacéutico e industrial, y métodos y procedimientos para la producción de tales composiciones.

Antecedentes de la invención

- 10 Los productos farmacéuticos que contienen ácidos grasos omega-3 de cadena muy larga (AG n-3 CML) se utilizan actualmente para tratar cientos de miles de pacientes, y potencialmente se utilizarán pronto para tratar, a millones de pacientes que tienen o están en riesgo de desarrollar una enfermedad cardiovascular. Además, se está considerando el uso de estas sustancias en productos farmacéuticos para tratar otros trastornos.

- 15 Los AG n-3 CML no se puede sintetizar químicamente *de novo* de forma económica, por lo tanto, se debe extraer de una fuente biológica. Con tales fuentes, la mayor parte de los AG n-3 CML se encontrará en estructuras celulares tales como membranas o cuerpos lipídicos y, por lo tanto, se asociarán con otras moléculas que pueden no ser deseadas en un producto farmacéutico. En estos casos, los AG n-3 CML se deberán extraer y purificar hasta cierto punto antes de su uso.

- 20 Los fabricantes farmacéuticos actualmente confían en el pescado como fuente de AG n-3 CML para la producción de sustancias farmacológicas. Sin embargo, la dependencia exclusiva del aceite de pescado para tales fines conlleva una serie de riesgos graves para los fabricantes de productos farmacéuticos y las compañías farmacéuticas, así como para los pacientes que reciben dichos medicamentos. Tales riesgos incluyen, pero no se limitan a, aquellos asociados con una posible escasez de suministros, que pueden ser financieramente devastadores para las compañías farmacéuticas, así como afectar negativamente a los pacientes que dependen de los medicamentos para su bienestar.

- 25 El ácido eicosapentaenoico (EPA, por sus siglas en inglés) es un AG n-3 CML utilizado como un metabolito activo en sustancias farmacológicas. Para permitir que los pacientes toleren bien la terapéutica y alcancen los niveles de biodisponibilidad requeridos para que el fármaco produzca los efectos deseados, es deseable que el EPA se administre en una forma altamente purificada.

- 30 La producción de productos farmacéuticos u otros agentes terapéuticos a partir del aceite de pescado es compleja y existe la posibilidad de que la composición del producto final se altere debido a la variabilidad inherente en el método de captura y/o cría y producción de aceite de pescado. También existen preocupaciones generalizadas sobre la sostenibilidad a largo plazo de las reservas de peces silvestres y la acuicultura.

Por lo tanto, existe una gran necesidad de fuentes alternativas de EPA al aceite de pescado que sean susceptibles de un posterior grado de purificación de EPA deseable para su uso en la producción de productos farmacéuticos u otros agentes terapéuticos.

- 35 Wen & Chen describen la producción de EPA en la diatomea *Nitzschia laevis* (*Appl. Microbiol Biotechnol* (2001) 57: 316-322) y en otras microalgas (*Biotechnology Advances* (2003) 21: 273-294). Renaud *et al.* describen microalgas para su uso en acuicultura tropical y su composición química, que incluye EPA. El documento de patente de EE.UU. 5 340 594 describe productos alimenticios que tienen una alta concentración de ácidos grasos omega-3 altamente insaturados.

- 40 Los métodos industriales actuales para la producción de EPA de alta pureza a menudo realizan una etapa de concentración (en la cual los ácidos grasos de cadena corta y los ácidos grasos saturados se retiran de la mezcla) seguido de una etapa de purificación (en la que se retiran los compuestos con similitud fisicoquímica y estructural al EPA).

- 45 El primer método a menudo es incapaz de separar el EPA del ácido araquidónico (ARA, por sus siglas en inglés) y otros ácidos grasos que comprenden 20 carbonos o más y que contienen al menos un doble enlace (ácidos grasos que se concentran simultáneamente), por lo tanto, es altamente deseable el desarrollo de fuentes de EPA distintas al aceite de pescado en el que se minimiza el contenido de estos ácidos grasos.

- 50 Los métodos de purificación experimentan dificultades para separar moléculas que son fisicoquímicamente y estructuralmente similares a EPA. La especie molecular más común encontrada naturalmente con mayor similitud con EPA es otro ácido graso, ARA. El desarrollo de fuentes de EPA distintas al aceite de pescado que están sustancialmente libres de tales moléculas es, por lo tanto, altamente deseable.

Tales fuentes también deberían estar idealmente libres de ácidos grasos que no se encuentran en concentraciones apreciables, o en absoluto, en la dieta de las poblaciones humanas comunes, ya que su actividad biológica puede no estar bien caracterizada, lo que las hace inadecuadas para uso farmacéutico. Esto es especialmente cierto cuando

dichos ácidos grasos tienen una similitud estructural o fisicoquímica suficiente con el EPA que sería difícil de purificar a partir del EPA.

5 El EPA se sintetiza como parte de una ruta biosintética paralela dual que produce ácidos grasos omega-3 y omega-6 (por ejemplo, véase Damude y Kinney (*Lipids* 42: 179-185, 2007)). Muchas de las enzimas son compartidas entre las vías y actuarán sobre la forma omega-3 u omega-6 de un ácido graso, por lo que los productos de la vía omega-6 se encuentran comúnmente junto con los de la vía omega-3. En particular, el ARA se encuentra comúnmente junto con el EPA. Cada etapa de la ruta sintética está catalizada por enzimas separadas y no es infrecuente que los productos intermedios de la ruta se acumulen, estos incluirán ácidos grasos con un número menor de enlaces dobles pero el mismo número de moléculas de carbono. ARA y EPA también pueden ser sustratos para una mayor elongación y desaturación en ácidos grasos tal como el ácido docosapentaenoico (DPA, por sus siglas en inglés) y el ácido docosahexaenoico (DHA, por sus siglas en inglés). Por lo tanto, no es sorprendente que los organismos que contienen EPA generalmente también contengan cantidades significativas de ARA y ácidos grasos que se concentran simultáneamente.

15 Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de proporcionar EPA en una forma que sea susceptible de una purificación de alto grado para uso terapéutico y en abundancia. En particular, existe la necesidad de proporcionar EPA en una forma que sea separable de otros ácidos grasos que sean fisicoquímicamente y estructuralmente similares a EPA (por ejemplo, ARA).

Compendio de la invención

20 En un primer aspecto, la invención proporciona una diatomea cultivada de forma heterótrofa que comprende ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido araquidónico (ARA) en una relación de al menos 17:1 donde el EPA forma al menos el 1.5% p/p del peso seco de la diatomea y la diatomea es *Nitzschia laevis*.

Preferiblemente no hay ácido juniperónico (JPA, por sus siglas en inglés) y/o ácido sciadónico en los ácidos grasos que se concentran simultáneamente.

25 En un segundo aspecto, la invención proporciona un método para producir una diatomea que comprende ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido araquidónico (ARA) en una relación de al menos 17:1 y al menos 1.5% p/p del peso seco de la diatomea es EPA, que comprende las etapas de:

a. cultivar diatomeas en cultivos heterotróficos que contienen una solución nutritiva que comprende:

- 30 (i) una fuente de carbono orgánico a una concentración inicial de al menos 0.5 M de carbono
 (ii) una relación en moles de carbono orgánico a nitrógeno de no más de 30:1 (mol C: mol N) y;
 (iii) una fuente no limitante de silicato que no cae por debajo de 150µM; y

b. recuperar la diatomea del cultivo heterotrófico.

Preferiblemente, el método comprende además la etapa de extraer ácidos grasos de dicha biomasa para producir una composición de ácidos grasos.

35 Preferiblemente, el método comprende además la etapa de enriquecer la composición de ácidos grasos en EPA o purificar EPA a partir de la composición de ácidos grasos para producir una composición de ácidos grasos enriquecida o purificada.

Preferiblemente la diatomea es *Nitzschia laevis*.

Preferiblemente, las diatomeas se cultivan en cultivo heterotrófico en un fermentador.

40 Preferiblemente, el cultivo comprende fermentación continua.

Preferiblemente las diatomeas comprenden especies de *Nitzschia*.

Preferiblemente, el cultivo se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 12°C a aproximadamente 35°C.

Preferiblemente, el cultivo se lleva a cabo a un pH de aproximadamente 7.0 a aproximadamente 8.7.

Preferiblemente, dicha fuente de carbono comprende glucosa.

45 Preferiblemente, dicha fuente de carbono se selecciona de glucosa, almidón hidrolizado o suero de leche hidrolizado.

Preferiblemente, dicha fuente de nitrógeno está en forma de nitrato de sodio o nitrato de potasio.

Preferiblemente, dicha fuente de nitrógeno está enriquecida con una fuente de aminoácidos.

Preferiblemente, dicha fuente de aminoácidos se selecciona de licor de maceración de maíz, extracto de levadura, triptona, peptonas, lisina y glutamato.

Preferiblemente dicho silicato está en forma de metasilicato de sodio o potasio.

5 Preferiblemente, la solución nutritiva comprende fósforo en forma de fosfato.

Preferiblemente, la relación en moles de carbono orgánico a fósforo en forma de fosfato no es superior a 1250:1 (mol C:mol P).

Preferiblemente, la relación en moles de carbono a silicio en forma de fuente de silicato es de 100:1 a 850:1.

Preferiblemente, la solución nutritiva comprende fósforo en forma de fosfato.

10 Preferiblemente, la relación en moles de carbono a fósforo en forma de fosfato es de 100:1 a 1250:1.

Breve descripción de los dibujos

Las realizaciones de la invención se describirán ahora, solo a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

15 Figura 1: muestra la relación entre las relaciones EPA:ARA en biomasa y concentraciones mínimas de metasilicato de sodio en el medio en el que se forma la biomasa.

Descripción detallada de la invención

20 Inesperadamente, los presentes autores han encontrado que es posible obtener composiciones de microorganismos heterotróficos que comprenden EPA que contienen una relación de EPA a ARA de alrededor de 11:1 o más, mientras que al mismo tiempo también contienen EPA a más de 8 veces el nivel de todos los ácidos grasos que se concentran simultáneamente combinados. Tales microorganismos se pueden producir en cultivo a una tasa de rendimiento superior a 5 mg de EPA/L/h y con un contenido de EPA superior al 1.5% del peso total de células secas, lo que los hace relevantes en un proceso industrial.

25 También inesperadamente, los inventores han encontrado que es posible obtener composiciones de diatomeas heterotróficas que comprenden EPA que contienen una relación de EPA a ARA de aproximadamente 17:1 o más. Tales microorganismos se pueden producir en cultivo a una tasa de rendimiento superior a 5 mg de EPA/L/h y con un contenido de EPA superior al 1.5% del peso total de células secas, lo que los hace relevantes en un proceso industrial.

30 Una parte de la presente invención es el reconocimiento de que no solo es deseable, para el propósito de concentrar la mezcla de ácidos grasos, controlar las cantidades de ácidos grasos que se concentran simultáneamente (como se define en la presente memoria) en relación con el EPA que se puede acumular en el cultivo heterotrófico de microorganismos, sino que también es factible hacerlo a través del control de las condiciones de crecimiento de estos microorganismos.

35 Otra parte de la presente invención es el reconocimiento de que no solo es deseable controlar las cantidades relativas de moléculas similares fisicoquímicamente o estructuralmente a EPA que se pueden acumular en el cultivo heterotrófico de microorganismos para los fines de la purificación de EPA, sino que también es factible hacerlo a través del control de las condiciones de crecimiento de estos microorganismos.

Otra parte de la presente invención es el reconocimiento de que son los niveles relativos de las moléculas, en lugar de los niveles absolutos, los que son fisicoquímicamente y estructuralmente similares a los EPA, que son críticos para la concentración y la purificación y que, sorprendentemente, la producción máxima de EPA en la biomasa no necesariamente equivale a la producción máxima de EPA altamente purificado.

40 Por consiguiente, la invención proporciona un cultivo de diatomeas de forma heterotrófica que comprende ácido eicosapentaenoico y ácido araquidónico en una relación de al menos 17:1 donde el ácido eicosapentaenoico forma al menos el 1.5% p/p del peso seco de la diatomea y la diatomea es *Nitzschia laevis*.

45 La invención proporciona además: un método para producir una diatomea que comprende ácido eicosapentaenoico y ácido araquidónico en una relación de al menos 14:1 y al menos 1.5% p/p del peso de células secas como ácido eicosapentaenoico que comprende:

- a. cultivar diatomeas en cultivos heterotróficos que contienen una solución nutritiva que comprende:
 - (i) una fuente de carbono orgánico a una concentración inicial de al menos 0.5 M de carbono
 - (ii) una relación en moles de carbono orgánico a nitrógeno de no más de 30:1 (mol C:mol N) y;
 - (iii) una fuente no limitante de silicato que no cae por debajo de 150µM; y

- b. recuperar la diatomea del cultivo heterotrófico.

Definiciones y abreviaturas

- 5 El ácido graso omega-3 es un ácido graso con el primer enlace doble a tres átomos de carbono del extremo n-metilo de la molécula. Omega-3 a menudo se acorta a n-3.
- El ácido graso omega-6 es un ácido graso con el primer enlace doble a seis átomos de carbono del extremo n-metilo de la molécula. Omega-6 a menudo se acorta a n-6.
- 10 Los ácidos grasos se describen en la forma CX:Y, en donde el número X describe el número de átomos de carbono y el número Y describe el número de dobles enlaces en el ácido graso. Donde Y es igual a cero, el ácido graso se describe como saturado, donde Y es mayor que cero, el ácido graso se describe como insaturado. La posición y el tipo de los dobles enlaces se pueden especificar como, por ejemplo, "cis 5, 11, 14" donde los números reflejan la ubicación de los dobles enlaces carbono-carbono, contando desde el extremo del ácido carboxílico de la molécula.
- 15 Se entiende que un término tal como C20:5 incluye tanto el ácido graso libre como las formas esterificadas del ácido graso con el número de átomos de carbono y los dobles enlaces que se refieren únicamente a la porción de ácido graso del éster.
- EPA, C20:5 n-3, ácido eicosapentaenoico, es un ácido graso omega-3 con veinte átomos de carbono y cinco dobles enlaces.
- ARA, C20:4 n-6, ácido araquidónico, es un ácido graso omega-6 con veinte átomos de carbono y cuatro enlaces dobles.
- 20 Los ácidos grasos que se concentran simultáneamente se definen como ácidos grasos, excluyendo EPA y ARA, que comprenden 20 carbonos o más y contienen al menos un doble enlace. Estos incluyen, pero no se limitan a las diversas formas de C20:1, C20:2, C20:3, C20:4, C22:5, C22:6 y C24:1.
- DHA, C22:6 n-3, ácido docosahexaenoico, es un ácido graso omega-3 con veintidós átomos de carbono y seis dobles enlaces.
- 25 DPA, C22:5 n-3, ácido docosapentaenoico, es un ácido graso omega-3 con veintidós átomos de carbono y cinco dobles enlaces.
- DGLA (por sus siglas en inglés), C20:3 n-6, el ácido dihomo-gamma-linoleico es un ácido graso omega-6 con veinte átomos de carbono con tres dobles enlaces.
- 30 ETAn-3 (por sus siglas en inglés), C20:4 n-3, el ácido eicosatetraenoico es un ácido graso omega-3 con veinte átomos de carbono y cuatro dobles enlaces.
- TFA (por sus siglas en inglés), ácidos grasos totales, significa la suma de todos los ácidos grasos en una composición o mezcla.
- DCW (por sus siglas en inglés), peso de células secas, significa el peso de una biomasa una vez que se ha retirado toda el agua.
- 35 Cultivo heterotrófico significa un cultivo de organismos para el que al menos el 90% del suministro de energía para el cultivo se obtiene a partir de los nutrientes suministrados que suelen ser una forma o formas de carbono orgánico (p. ej., glucosa, acetato). Por lo tanto, un máximo del 10% del suministro de energía se obtiene a partir de la energía lumínica. Preferiblemente, menos del 5% o menos del 1% del suministro de energía se obtiene a partir de la energía lumínica. Más preferiblemente, la totalidad del suministro de energía proviene de los nutrientes suministrados.
- 40 Cultivo fotoautotrófico significa un cultivo de organismos para el cual la única fuente de energía es la luz.
- Cultivo mixotrófico significa un cultivo de organismos para los cuales la fuente de energía es una mezcla de un 10% o más de energía lumínica y menos de un 90% de derivados de nutrientes suministrados.
- 45 La limitación de nutrientes significa que la ausencia o el bajo nivel del nutriente en cuestión hace que el organismo crezca más lentamente de lo que lo haría si el nutriente estuviera presente en niveles más altos. Por lo tanto, la provisión no limitante de nutrientes significa que otros factores además del nutriente en cuestión son limitantes en el crecimiento del organismo y la provisión de mayores cantidades del nutriente en cuestión no tendría el efecto de aumentar el crecimiento. Por lo tanto, el nutriente está presente en cantidades suficientes para que no se agote por su incorporación a la biomasa, de modo que la concentración libre en la solución de nutrientes no caiga a cero.

Composiciones de la invención

- 50 Los microorganismos modificados genéticamente son potencialmente capaces de acumular niveles significativos de EPA cuando se producen en cultivos heterotróficos. Damude *et al.* en US20060115881 proporcionan composiciones

que comprenden EPA producido en cepas de levaduras modificadas genéticamente. Sin embargo, estas contienen relaciones relativamente bajas de EPA respecto de otras moléculas que son fisicoquímicamente y estructuralmente similares a EPA, lo que las hace poco adecuadas para la concentración y la purificación. Los autores no enseñan nada sobre la relevancia de los ácidos grasos que se concentran simultáneamente en la producción de EPA purificado y no sugieren cómo se podría abordar este problema.

Xue *et al.* en el documento de patente de EE.UU. 2009/0093543 proporcionan composiciones que comprenden EPA producido en cepas de levaduras modificadas genéticamente. Una de estas composiciones ahora está disponible comercialmente y actualmente se comercializa como Futurebiotics Newharvest OMEGA-3. Las composiciones descritas contienen cantidades particularmente altas de EPA (más del 50% del total de ácidos grasos en algunos casos) y bajas cantidades de ARA, pero contienen cantidades significativas de ácidos grasos C20 que se concentran simultáneamente que los hacen poco adecuados para el presente propósito. Además, los autores describen la presencia de ácido juniperónico (C20:4 cis 5, 11, 14, 17) en el perfil de ácidos grasos de al menos una de sus cepas de levadura modificadas genéticamente. Este ácido graso no solo es fisicoquímicamente y estructuralmente similar al EPA, lo que hace que sea particularmente difícil de separar, sino que, además, normalmente no se encuentra en la dieta humana, lo que lo hace particularmente problemático como contaminante en cualquier producto de EPA purificado para uso en humanos. Los autores no enseñan la importancia de reducir las proporciones de los ácidos grasos que contaminan simultáneamente a la producción de EPA purificado o cómo se podrían lograr tales composiciones.

En los documentos de patente de EE.UU. 5683898 y 5798259, Yazawa *et al.* proporcionan cultivos de *E. coli* transgénicos con EPA en torno al 1.5% del total de ácidos grasos. Los autores no especifican la presencia o ausencia de otros ácidos grasos en su material y no discuten la purificación de EPA a partir de su material. Los autores no enseñan nada sobre la relevancia de los ácidos grasos que se concentran simultáneamente en la producción de EPA purificado y no sugieren cómo se podría abordar este problema.

Ni Damude *et al.*, Xue *et al.*, Yazawa *et al.* ni cualquier otro autor ha proporcionado composiciones que comprenden EPA producido en microorganismos transgénicos que al mismo tiempo contienen relaciones suficientemente altas de EPA respecto de otros ácidos grasos fisicoquímicamente o estructuralmente similares para hacerlos adecuados para la concentración y la purificación.

Además, ni Damude *et al.*, Xue *et al.*, Yazawa *et al.* ni ningún otro autor ha enseñado que los microorganismos cultivados deberían comprender intervalos prescritos para las relaciones de EPA respecto de otras moléculas fisicoquímicamente o estructuralmente similares a las que se enseñan en la presente memoria, ni tampoco enseñan específicamente cómo se debe lograr la eliminación de tales moléculas.

Ciertos microorganismos procariotas, que incluyen pero no se limitan a ciertas cepas de bacterias marinas no modificadas genéticamente (no GE) tienen una capacidad inherente para producir EPA *de novo* y son capaces de acumular cantidades de EPA en cultivo sin recurrir a modificaciones genéticas. Por ejemplo, Yazawa *et al.* (*J. Biochem.* 103: 5-7 1988) proporcionan composiciones que comprenden EPA de la bacteria SCRC-8132 no-GE. Los autores afirman que "sorprendentemente, otros ácidos grasos poliinsaturados, como el araquidónico (C20: 4)... ..no se detectaron en absoluto [en la bacteria cultivada]" y "esta composición única de ácidos grasos hace que sea fácil aislar el EPA de un cultivo de esta cepa bacteriana", pero no hace comentarios sobre otros ácidos grasos C20 y su papel en la concentración. Además, los autores no enseñan cómo se pueden alcanzar niveles altos de EPA y niveles bajos de ARA en el cultivo de un organismo eucariota. Bowman *et al.* (*Int J Syst Bacteriol* 47: 1040-1047, 1997) proporcionan composiciones que comprenden microorganismos procariotas con altos niveles de EPA como una proporción del total de ácidos grasos. Los autores no registran los ácidos grasos C20 distintos de EPA y ARA, y en algunos casos parecen no haber medido ARA, por lo que no revelan nuestra composición. Los autores tampoco enseñan la relevancia de tales composiciones para la concentración y la purificación, ni sugieren cómo se podrían obtener tales composiciones en el cultivo de un organismo eucariota.

Ninguna de estas fuentes procarióticas se ha podido comercializar debido a los bajos niveles de rendimiento. La tasa de rendimiento máxima reportada por Yazawa *et al.* por ejemplo, es 1.1 mg de EPA/L/h pero el EPA forma menos del 0.5% del peso de células secas. Los procariotas no-GE no pueden competir como fuente de EPA con microorganismos eucariotas debido al peso seco relativamente bajo del EPA y, por lo tanto, son poco adecuados para el propósito actual. Dado que los organismos procariotas y eucariotas son fundamentalmente diferentes, las enseñanzas de uno no se pueden aplicar directamente al otro, por lo que no puede haber una expectativa razonable de que las observaciones de Yazawa *et al.*, o Bowman *et al.* ni de ningún otro autor sobre el contenido de EPA de los organismos procariotas de origen natural puedan utilizarse para desarrollar aún más la producción de EPA eucariota.

Varios autores proporcionan composiciones que comprenden EPA como un componente de un microorganismo producido en cultivos de microorganismos eucariotas de origen natural que utilizan la luz como su principal fuente de energía para el crecimiento. Si la luz es la única fuente de energía, estos cultivos se consideran fotosintéticos o fotoautotróficos. El carbono orgánico se puede añadir a un cultivo fotosintético para convertirlo en mixotrófico. Estos cultivos generalmente se producen en estanques o pistas abiertas, o en fotobiorreactores suministrados internamente con grandes cantidades de luz artificial y/o compuestos de material transparente con altas relaciones de superficie respecto de volumen para permitir que la luz pase al cultivo. Los bajos rendimientos, los altos costes de capital y/o las

dificultades técnicas asociadas con dicha producción y los costes consiguientes de producir EPA de esta manera los hacen inadecuados para el propósito actual.

5 Por ejemplo, Vazhappilly y Chen (*JAOCS* 75: 393-397, 1998) proporcionan composiciones que comprenden EPA en varias especies de microalgas cultivadas en condiciones fotoautotróficas y la mejor de ellas solo mostró tasas de crecimiento promedio de alrededor de 256 mg de células por día, y muchas de ellas muestran mucho más bajas. Los autores señalan que "la alta acumulación de ácido araquidónico (ARA, C20: 4n-6) con EPA o DHA es desventajosa porque ARA puede presentar efectos perjudiciales para la salud y problemas en la recuperación de EPA", pero no sugieren medios para reducir el contenido de ARA en cultivos heterotróficos. Además, los autores afirman que "el cultivo de ARA fue relativamente bajo en las 20 microalgas excepto en *Por[phyridium] cruentum*". Dado que muchas de las especies mencionadas tienen cantidades muy similares de los dos ácidos grasos y dos incluso tienen más ARA que EPA, esto sugiere que los autores consideran que la cantidad absoluta de ARA es importante en lugar de la relación de EPA a ARA. Esto enseña lejos de nuestra invención, ya que enseñamos que es la relación de EPA a ARA lo que es importante en lugar de la cantidad absoluta de cualquiera de los ácidos grasos.

15 Ciertos microorganismos eucariotas no-GE, que incluyen pero no se limitan a microalgas, hongos y levaduras, pueden crecer de forma heterótrofa y pueden acumular niveles significativos de EPA cuando se producen en cultivos heterotróficos. Estos tienen la ventaja de que se pueden producir en interiores en reactores esterilizables por vapor convencionales con relaciones relativamente bajas de superficie respecto de volumen en comparación con los fotobiorreactores.

20 Yongmanitchai y Ward (*Process Biochemistry* 24: 117-125, 1989) proporcionan una lista de microorganismos que producen EPA y DHA. Los autores no distinguen entre organismos que se pueden cultivar de forma heterótrofa o se deben cultivar fotosintéticamente, por lo que es imposible anticipar a partir de esta referencia si estos organismos son adecuados para la producción industrial de EPA. Tampoco es posible determinar si los datos de composición de ácidos grasos descritos provienen de cultivos desarrollados de forma heterótrofa. En ningún caso, los datos proporcionados sobre el contenido de ácidos grasos de los organismos permiten la identificación completa del contenido de EPA en relación con el ARA y otros ácidos grasos que se concentran simultáneamente, de manera que describen la composición de esta invención. Los autores discuten la producción de EPA de alta pureza, pero no discuten el efecto que tienen otros ácidos grasos poliinsaturados en la facilidad con que se puede purificar el EPA. La referencia no sugiere la composición descrita en la presente memoria, por lo que dicha composición es relevante para la concentración y la purificación, ni que exista la expectativa de que uno pueda tener éxito en la obtención de dicha composición.

30 Barclay en los documentos de patentes de EE.UU. 5130242 y 5908622 da a conocer el aislamiento, el crecimiento heterotrófico y los perfiles de ácidos grasos de varias cepas de algas. La presencia simultánea de EPA y la ausencia de ARA se dan a conocer para varios de estos (crecimiento en condiciones de selección estándar), mientras que un número más tiene niveles bajos de ARA en comparación con EPA. La mayoría de estos tienen relaciones de EPA:DHA inferiores a 8, lo que las hace poco adecuadas para los propósitos actuales.

La cepa BRBG se da a conocer en la tabla 3 del documento de patente de EE.UU. 5130242 como que no tiene AA (ARA) y una relación de EPA a DHA de 12 y en la tabla 4 que tiene una relación de EPA a DHA de 10.9. Los mismos datos se utilizan en el documento de patente de EE.UU. 5908622.

40 Sin embargo, no se da a conocer el ácido dihomo-gamma-linoleico (DGLA, por sus siglas en inglés) o el ácido eicosatetraenoico (ETA, por sus siglas en inglés), por lo que el autor claramente no reconoce la importancia de los niveles relativos de otros ácidos grasos de cadena larga de 20 carbonos o más con el propósito de la concentración y purificación. Dadas las cantidades relativamente bajas de EPA en el perfil de ácidos grasos, incluso pequeñas cantidades de estos u otros compuestos C20 podrían tener un efecto significativo en la relación de EPA a los ácidos grasos que se concentran simultáneamente. No se proporcionan datos de productividad para el crecimiento de estas cepas.

El autor considera la purificación de los ácidos grasos omega-3 como un grupo, pero no considera la purificación de los ácidos grasos individuales, por lo que no enseña la relevancia de la composición para la concentración y la purificación de los ácidos grasos individuales.

50 Mientras que ninguno de los ácidos grasos omega-6, incluido el ARA, son desventajosos para propósitos dietéticos, el autor afirma que "también se pueden aislar cepas que tienen menos del 1% (como % de ácidos grasos totales) de los HUFA (ácidos grasos altamente insaturados), por sus siglas en inglés, C20: 4n-6 y C22: 5n-6 indeseables para algunas aplicaciones", lo que indica que este autor considera que la cantidad total en lugar de la cantidad relativa de ARA es importante. Esto enseña lejos de la presente invención que es la relación de EPA a ARA lo que es importante en lugar de la cantidad absoluta de cualquiera de los ácidos grasos.

Varios autores proporcionan composiciones que comprenden EPA producido en diatomeas. Por ejemplo, Tan y Johns (*Journal of Applied Phycology* 8: 59-64, 1996) dan a conocer el crecimiento heterotrófico de varias diatomeas, pero no registran ni mencionan el contenido de ARA de las células ni el contenido de otros ácidos grasos que se concentran simultáneamente distintos de C20:3. La referencia no sugiere la composición descrita en la presente memoria, por lo

que dicha composición es relevante para la concentración y la purificación, ni que existe la expectativa de que uno pueda tener éxito en la obtención de dicha composición.

5 Kitano et al. (*Journal of Applied Phycology* 9: 559-563, 1997) dan a conocer el crecimiento heterotrófico de la diatomea *Navicula saprophila*, pero la relación de EPA a C20:4 obtenida es menor que 10. El contenido de otros ácidos grasos de cadena larga de 20 carbonos o más no se describe, ni se da ninguna consideración sobre la purificación. La referencia no sugiere nuestra composición, por lo que tal composición es relevante para la concentración y la purificación, ni que exista cualquier expectativa de que uno pueda tener éxito en obtener tal composición.

10 En los documentos de patente de EE.UU. 5244921 y 5567732, Kyle y Gladue describen métodos para producir ácido eicosapentaenoico a partir de la diatomea *Nitzschia alba* en un cultivo heterotrófico. En células producidas por sus métodos, la relación de EPA a C20:4 es solo de 4:1. La relación de EPA a otros ácidos grasos que se concentran simultáneamente no se considera ni es el efecto probable en la purificación. La referencia no sugiere nuestra composición, por lo que tal composición es relevante para la concentración y la purificación, ni que exista la expectativa de que uno pueda tener éxito en obtener tal composición.

15 Chu et al. (*Journal of Applied Phycology* 8: 389-396, 1996) dan a conocer el cultivo heterotrófico de la diatomea *Nitzschia inconspicua* sobre acetato y glucosa. Los autores no describen el contenido de ácidos grasos de cadena larga de 20 carbonos o más, aparte de EPA y ARA. La relación de estos dos ácidos grasos es, en cualquier caso, inferior a 2 en condiciones heterotróficas. La referencia no sugiere la composición descrita en la presente memoria, por lo que una composición es relevante para la concentración y la purificación, ni que exista la expectativa de que uno pueda tener éxito en la obtención de dicha composición.

20 Wen y Chen en varios artículos (*Biotechnology Letters* 22: 727-733, 2000; *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 25: 218-224, 2000; *Enzyme and Microbial Technology* 29: 341-347, 2001; *Biotechnol Bioeng* 75: 159-169, 2001.; *Biotechnol. Prog.* 18: 21-28, 2002; *Process Biochemistry* 37:1447-1453, 2002; *Process Biochemistry* 38: 523-529, 2002) han descrito la optimización de las condiciones de crecimiento heterotrófico para la diatomea *Nitzschia laevis*. Los autores trabajan para maximizar la producción de EPA pero no han dado ninguna indicación de que la relación de EPA a ARA sea importante o que se considere la optimización de la relación. Del mismo modo, no se tienen en cuenta los niveles relativos de EPA respecto de los ácidos grasos que se concentran simultáneamente, ni la concentración o purificación. Las referencias no muestran la composición descrita en la presente memoria, ni sugieren que esta composición sea relevante para la concentración y la purificación.

30 En Pahl et al. (*J Bioscience y Bioeng* 109: 235-239, 2010) los autores dan a conocer el crecimiento heterotrófico de la diatomea *Cyclotella cryptica* con el propósito de producir piensos para uso en la industria de la acuicultura. Los autores no consideran la posibilidad de producir EPA purificado ni el efecto que los niveles relativos de EPA respecto de otros ácidos grasos de cadena larga tendrían sobre la concentración o la purificación. En particular, las cantidades de ARA ni siquiera se dan a conocer en el documento. Los autores utilizan un medio rico en fuentes de nitrógeno, fosfatos y silicatos, pero con cantidades relativamente bajas de carbono. Como resultado, el contenido de EPA de las células permanece por debajo del 1.5% del peso de células secas. La referencia no sugiere la composición descrita en la presente memoria, por lo que una composición es relevante para la concentración y la purificación, ni que exista la expectativa de que uno pueda tener éxito en la obtención de tal composición.

40 Griffiths y Geiringer en el documento WO2008004900 proporcionan composiciones que comprenden EPA con bajos niveles de moléculas con propiedades estructurales y fisicoquímicas similares al EPA obtenidas a partir de diatomeas. Estos autores describen la conveniencia general de composiciones que comprenden EPA con niveles bajos de ciertos ácidos grasos para uso farmacoterapéutico. En particular, se clasifican ARA y otros ácidos grasos omega-3 y omega-6 que "puede disminuir el efecto deseado a través de acciones que pueden ser antagónicas, competitivas, bloquear, revertir, mediar, crear sinergias o alterar de otro modo el efecto beneficioso para la salud deseado del EPA" como no deseados. Los autores también describen la conveniencia general de composiciones que comprenden EPA con niveles bajos de los ácidos grasos no deseados mencionados anteriormente con el propósito de la purificación para posterior uso farmacoterapéutico. No consideran otros ácidos grasos C20 que no tienen efecto sobre el efecto beneficioso para la salud de EPA, pero que pueden afectar el grado en que se puede concentrar o purificar.

50 Mientras que los autores enseñan la conveniencia de composiciones de EPA con bajos niveles de ARA con fines terapéuticos, no logran sugerir las composiciones de la presente invención porque sus composiciones requieren una primera etapa de aislamiento de la biomasa, y sus composiciones no tienen en cuenta todos los ácidos grasos que se concentran simultáneamente, simplemente aquellos que tienen efectos sobre la actividad biológica de EPA. Además, no se enseña cómo se podrían obtener las composiciones de la presente invención ni el uso industrial de hacerlo.

55 Además, ni Griffiths ni Geiringer, ni ningún otro autor han enseñado que los intervalos prescritos para las relaciones de EPA a ARA o las moléculas de ácido graso que se concentran simultáneamente como se enseña en la presente memoria son importantes en el cultivo heterotrófico de microorganismos por lo que dan como resultado una composición susceptible de un alto grado de concentración y después de purificación.

Mientras que los cultivos heterotróficos de microorganismos, y en particular las microalgas eucariotas de origen natural, pueden actuar como una fuente alternativa de ácidos grasos omega-3 para los peces a través de la

5 acumulación de grandes cantidades de EPA en el cultivo, puede parecer sorprendente que se haya dedicado relativamente poco o ningún esfuerzo sistemático al desarrollo de tales fuentes de EPA que al mismo tiempo están suficientemente libres de moléculas fisicoquímicamente o estructuralmente similares al EPA para permitir un alto grado de concentración y purificación.

En un primer aspecto amplio, la invención proporciona una diatomea de crecimiento heterotrófico, *Nitzschia laevis*, en la que la relación de EPA a ARA es al menos 17:1 y EPA es al menos el 1.5% del peso de células secas, donde las relaciones están en una base ponderal.

10 La invención proporciona además: un método para producir una diatomea que comprende ácido eicosapentaenoico y ácido araquidónico en una relación de al menos 14:1 y al menos 1.5% p/p del peso de células secas como ácido eicosapentaenoico que comprende:

- a. cultivar diatomeas en cultivos heterotróficos que contienen una solución nutritiva que comprende:
 - (i) una fuente de carbono orgánico a una concentración inicial de al menos 0.5 M de carbono
 - (ii) una relación en moles de carbono orgánico a nitrógeno de no más de 30:1 (mol C: mol N) y;
 - 15 (iii) una fuente no limitante de silicato que no cae por debajo de 150 μM ; y
- b. recuperar la diatomea del cultivo heterotrófico.

Preferiblemente, la composición comprende una relación de EPA a ARA de al menos 15:1.

20 Preferiblemente, la composición comprende una relación de EPA a los ácidos grasos que se concentran simultáneamente de al menos 9:1, más preferiblemente la relación es de al menos 10:1, más preferiblemente de al menos 11:1 e incluso más preferiblemente de al menos 12:1.

Preferiblemente, menos del 1% p/p de los ácidos grasos totales es ácido juniperónico (que es un ácido graso que se concentra simultáneamente). Más preferiblemente, la composición comprende menos de 0.5% p/p de ácido juniperónico. Lo más preferiblemente, no está presente el ácido juniperónico en la composición.

25 Preferiblemente, menos del 1% p/p del total de ácidos grasos es ácido sciadónico (que es un ácido graso que se concentra simultáneamente). Más preferiblemente, la composición comprende menos de 0.5% p/p de ácido sciadónico. Lo más preferiblemente, no está presente el ácido sciadónico en la composición.

Preferiblemente, los microorganismos cultivados de forma heterótrofa son diatomeas del género *Nitzschia*, incluso más preferiblemente los microorganismos están comprendidos de la diatomea unicelular marina conocida como *Nitzschia laevis*.

30 Preferiblemente, la composición de biomasa comprende una proporción de su peso total seco como ácidos grasos; la proporción que se encuentra en el intervalo de entre 5 y 80%, una proporción de la cual será EPA; la proporción de EPA (en peso seco de los ácidos grasos) que se encuentra en el intervalo de entre 2 y 80%, más preferiblemente la proporción es más del 10%, más preferiblemente más del 20% e incluso más preferiblemente más del 30%. Típicamente, la proporción (en peso seco) de ácidos grasos totales que es EPA está en el intervalo de 10 a 80%, de 35 20 a 80% o de 30 a 80%.

40 Normalmente, la biomasa microbiana se produce a partir de un cultivo microbiano mediante la recolección de los microbios del medio de cultivo heterotrófico, opcionalmente, el calor o la destrucción de las células (por ejemplo, para desnaturalizar enzimas endógenas) y la formación de las células en una biomasa (p. ej., una torta de biomasa). La biomasa se seca opcionalmente para reducir o retirar el agua. La formación de la biomasa de la invención no incluye las etapas de extracción o purificación para recuperar ácidos grasos o materiales distintos del agua. Sin embargo, la relación EPA:ARA de la biomasa de la invención sirve para facilitar las etapas posteriores de extracción y purificación utilizadas para enriquecer el EPA con fines terapéuticos. La biomasa microbiana de la invención se puede someter a una o más etapas de extracción para extraer ácidos grasos de la biomasa para producir una composición de ácidos grasos. Las técnicas de extracción adecuadas son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, la biomasa se puede 45 extraer con un disolvente lipídico no selectivo (p. ej., dimetil éter o etanol cuasi-crítico) y recuperarse del disolvente como un residuo.

Después de la extracción, el nivel de EPA en dicha composición de ácidos grasos es de 5 a 90%, de 5 a 75% o de 5 a 50% en peso de los ácidos grasos en la composición. La relación de EPA a ARA se puede mantener sustancialmente al mismo nivel que antes de la extracción, preferiblemente al menos 14:1. La relación de EPA a ácidos grasos totales 50 que se concentran simultáneamente se puede retener sustancialmente al mismo nivel que antes de la extracción, preferiblemente al menos aproximadamente 8:1.

Después de la extracción, la etapa adicional de enriquecer la composición de ácidos grasos en EPA o purificar EPA a partir de la composición de ácidos grasos se puede realizar utilizando técnicas bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, el material extraído se puede tratar con ácidos, álcalis y/o enzimas en presencia de alcohol o agua para

formar mezclas de ésteres alquílicos de ácidos grasos o ácidos grasos. Las mezclas se pueden concentrar y purificar después adicionalmente para lograr un estándar de pureza requerido. La relación de EPA a ARA en la composición se puede mantener sustancialmente al mismo nivel que antes del enriquecimiento y/o purificación, preferiblemente al menos 14:1. La relación de EPA a ácidos grasos totales que se concentran simultáneamente en la composición también se puede retener sustancialmente al mismo nivel que antes del enriquecimiento y/o purificación, preferiblemente al menos aproximadamente 8:1. Más preferiblemente, las relaciones de EPA a ARA y EPA a ácidos grasos totales que se concentran simultáneamente aumentarán después de la etapa de enriquecimiento y/o purificación. Sin embargo, dada la dificultad relativa y el costo de separar EPA de ARA y los ácidos grasos que se concentran simultáneamente, hay una ventaja en tener relaciones relativamente altas de EPA a ARA y EPA a ácidos grasos que se concentran simultáneamente en la composición antes de la etapa de enriquecimiento y/o purificación.

Después del enriquecimiento o la purificación, el nivel de EPA en dicha composición de ácidos grasos es al menos el 30%, o al menos el 50%, o es una composición de EPA de alta pureza de al menos el 60%, al menos aproximadamente el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 97% en peso de los ácidos grasos en la composición. La composición de EPA de alta pureza para los fines de esta especificación se puede definir en consecuencia. Tal composición de EPA de alta pureza que forma otro aspecto de la invención.

La diatomea de crecimiento heterotrófico de la invención o producida por el método de la invención se puede utilizar en la fabricación de un producto para consumo humano o animal. Tal producto podría ser formulado por un experto en la técnica utilizando técnicas conocidas, y puede incluir, por ejemplo, rellenos, vehículos, tampones, estabilizantes y conservantes. Puede tomar la forma de, por ejemplo, comprimidos, cápsulas, líquidos, soluciones, y también se puede combinar con otros productos alimenticios tal como panes y cereales, productos para untar y productos lácteos.

Puede ser mezclado con otros ácidos grasos o ésteres alquílicos de ácidos grasos.

La diatomea de crecimiento heterotrófico de la invención o producida por el método de la invención se puede utilizar en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una persona afectada por ciertas afecciones o trastornos médicos que incluyen, pero no se limitan a los seleccionados de la diabetes (tipo I, y tipo II), trastornos glucémicos, hipertensión asociada a la diabetes, cáncer, osteoartritis, enfermedades autoinmunes, artritis reumatoide, enfermedades inflamatorias y autoinmunes distintas de la artritis, enfermedades respiratorias, trastornos neurológicos, trastornos neurodegenerativos (que incluyen la enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, esquizofrenia, depresión mayor, depresión unipolar, depresión bipolar, trastorno obsesivo compulsivo, trastorno límite de la personalidad, depresión posparto, daño cerebral orgánico y lesión cerebral traumática), trastornos renales y del tracto urinario, trastornos cardiovasculares, trastornos cerebrovasculares, enfermedades degenerativas de los ojos, trastornos psiquiátricos, trastornos reproductivos, trastornos viscerales, trastornos musculares, trastornos metabólicos, hipertrofia prostática y prostatitis, impotencia e infertilidad masculina, mastalgia, calvicie de patrón masculino, osteoporosis, trastornos dermatológicos, dislexia y otras discapacidades de aprendizaje, caquexia por cáncer, obesidad, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, anorexia nerviosa, quemaduras, osteoartritis, osteoporosis, trastorno por déficit de atención/hiperactividad, y etapas tempranas del cáncer colorrectal, enfermedades pulmonares y renales, y trastornos asociados con el crecimiento y desarrollo anormales. Preferiblemente, la condición médica del trastorno es un trastorno cardiovascular o una condición relacionada con la obesidad.

Métodos de la invención.

Varios autores enseñan métodos mediante los cuales se pueden cultivar diatomeas para producir EPA.

Por ejemplo, Tan y Johns (*Journal of Applied Phycology* 8: 59-64, 1996) dan a conocer el crecimiento heterotrófico de varias diatomeas, pero no registran ni mencionan el contenido de ARA de las células ni el contenido de ácidos grasos con más de 20 átomos de carbono distintos de C20:3. Además de examinar los modos de crecimiento fotosintético y mixotrófico, los autores no intentan ninguna variación en los nutrientes ni comentan el hecho de que esto podría afectar la composición de los ácidos grasos. Estos autores no sugieren el método de la presente invención ya que no reconocen que las relaciones relativas de nutrientes de carbono, nitrógeno, silicato y fosfato tendrán un efecto sobre la composición de los ácidos grasos. Tampoco los autores describen que podría ser deseable que afecte las relaciones relativas de EPA respecto de ARA en la biomasa a través del contenido de nutrientes de los medios de crecimiento.

Kitano *et al.* (*Journal of Applied Phycology* 9: 559-563, 1997) dan a conocer el crecimiento heterotrófico de la diatomea *Navicula saprophila*, pero la relación de EPA a C20:4 obtenida es menor que 10. Además de examinar los modos de crecimiento fotosintético y mixotrófico, los autores no intentan ninguna variación en los nutrientes ni comentan el hecho de que esto afecta la composición de los ácidos grasos. Estos autores no sugieren el método de la presente invención ya que no reconocen que las relaciones relativas de nutrientes de carbono, nitrógeno, silicato y fosfato tendrán un efecto sobre la composición de los ácidos grasos. Tampoco los autores describen que podría ser deseable afectar las relaciones relativas de EPA a ARA en la biomasa a través del contenido de nutrientes de los medios de crecimiento.

En los documentos de patente de EE.UU. 5244921 y 5567732, Kyle y Gladue describen métodos para producir ácido eicosapentaenoico a partir de la diatomea *Nitzschia alba* en un cultivo heterotrófico. En esto, los autores enseñan lejos de la presente invención, privando a las células primero de nitrógeno y después de silicato antes de la cosecha. Las

células acumulan lípidos, pero la relación de EPA a C20:4 es solo de 4:1. La relación de EPA a otros ácidos grasos de cadena larga de 20 carbonos o más no se considera ni es el efecto probable sobre la purificación.

5 Wen y Chen en varios artículos (*Biotechnology Letters* 22: 727-733, 2000; *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 25: 218-224, 2000; *Enzyme and Microbial Technology* 29: 341-347, 2001; *Biotechnol Bioeng* 75: 159-169, 2001.; *Biotechnol. Prog.* 18: 21-28, 2002; *Process Biochemistry* 37: 1447-1453, 2002; *Process Biochemistry* 38: 523-529, 2002) han descrito la optimización de las condiciones de crecimiento heterotrófico para la diatomea *Nitzschia laevis*. Los autores han manipulado los niveles de nutrientes en sus medios de alimentación para maximizar la producción de EPA, pero no han intentado medir ningún nutriente residual distinto a la glucosa, y por lo tanto, no han investigado los efectos de la limitación por falta de nitrógeno, fosfato o silicato de nutrientes en el propio cultivo. Los autores no han alcanzado los intervalos prescritos para las relaciones de componentes de nutrientes como se enseña en la presente memoria, por lo que se puede obtener una relación suficientemente alta de EPA a ARA.

10 Estos autores no sugieren el método de la presente invención, ya que no reconocen que la limitación por falta de los nutrientes nitrógeno o silicato tiene un efecto en las relaciones relativas de EPA respecto de ARA en la biomasa. Tampoco los autores describen que podría ser deseable afectar las relaciones relativas de EPA respecto de ARA en la biomasa a través del contenido de nutrientes de los medios de cultivo.

15 En Pahl *et al.* (*J Bioscience y Bioeng* 109: 235-239, 2010) los autores dan a conocer el crecimiento heterotrófico de la diatomea *Cyclotella cryptica* con el propósito de producir piensos para uso en la industria de la acuicultura. Los autores utilizan un medio rico en fuentes de nitrógeno, fosfatos y silicatos, pero con cantidades relativamente bajas de carbono, por lo que no se logra la composición de nutrientes prescrita como se enseña en la presente memoria. Los autores no consideran la posibilidad de producir EPA purificado ni el efecto que los niveles relativos de EPA respecto de ARA tendrían sobre la concentración o la purificación; las cantidades de ARA ni siquiera se dan a conocer en el documento. Los autores señalan que se podría esperar que la limitación de silicato aumenta la proporción de ácidos grasos con un menor grado de insaturación, pero no considera que las relaciones de nutrientes cambiantes en los medios pueden afectar la relación entre diferentes ácidos grasos de cadena larga altamente insaturados. Estos autores no sugieren el método de la presente invención, ya que no reconocen que las relaciones relativas de nutrientes de carbono, nitrógeno, silicato y fosfato tendrán un efecto sobre las relaciones relativas de EPA respecto de ARA en la biomasa. Tampoco los autores describen que podría ser deseable afectar las relaciones relativas de EPA respecto de ARA en la biomasa a través del contenido de nutrientes de los medios de cultivo.

20 Roessler (*J Phycol* 24: 394-400, 1988) examina los efectos de la deficiencia de silicio en cultivos fotoautotróficos de la diatomea *Cyclotella cryptica*. El autor señala que la deficiencia de silicio aumenta la cantidad de lípidos en la materia celular, pero disminuye la proporción relativa de PUFA e incluso sugiere que si se produce biomasa para la producción de PUFA el medio de crecimiento debería estar repleto de nutrientes. Sin embargo, el autor no comenta ningún cambio en la relación entre los PUFA que causa la deficiencia de silicato. Además, no se tiene en cuenta la concentración o purificación de EPA a partir del material y la importancia de los niveles relativos de EPA respecto de otros ácidos grasos de cadena larga de 20 carbonos o más para este propósito. El autor no sugiere el método de la presente invención, ya que su método utiliza la luz como fuente principal de energía para el cultivo. Tampoco sugieren el éxito en métodos que no utilizan luz en la fuente principal de energía, ya que no se reconoce que las relaciones relativas de nutrientes de carbono, nitrógeno, silicato y fosfato tengan un efecto sobre las relaciones relativas de EPA respecto de ARA en la biomasa. El autor tampoco describe que pueda ser deseable afectar las relaciones relativas de EPA respecto de ARA en la biomasa a través del contenido de nutrientes de los medios de crecimiento.

25 Taguchi *et al.* (*J Phycol* 23: 260-267, 1987) examinan el contenido de lípidos de diatomeas marinas en condiciones de deficiencia de silicato en condiciones fotoautotróficas. Los autores afirman que "es esencial establecer una relación N:P:Si crítica para que se pueda asegurar que las algas utilicen silicato al principio en comparación con el nitrato y el fosfato. La baja concentración restante de nitrato y fosfato mantiene a las algas vivas para producir más lípidos por célula, incluso cuando las algas no pueden crecer más debido al agotamiento de silicato del medio", lo que indica que creen que la privación de silicato es beneficiosa y su enseñanza se aleja de esta invención. Los autores no describen ni consideran la composición de ácidos grasos de las células. Los autores no sugieren el método de la presente invención, ya que su método utiliza la luz como fuente principal de energía para el cultivo. Tampoco sugieren el éxito en los métodos que no utilizan la luz en la fuente principal de energía, ya que los autores enseñan lejos de la presente invención privando a las células de silicato para aumentar el rendimiento de lípidos.

30 Chu *et al.* (*Journal of Applied Phycology* 8: 389-396, 1996) dan a conocer el cultivo heterotrófico de la diatomea *Nitzschia inconspicua* sobre el acetato y la glucosa y también examinan los efectos de los niveles cambiantes de silicio y nitrógeno disponibles en el cultivo fotosintético. Los autores no comentan sobre el efecto que estos cambios tienen en la relación entre EPA y ARA, ni hay ninguna consideración de la concentración o purificación de EPA a partir del material y la importancia de los niveles relativos de EPA respecto de otros ácidos grasos de cadena larga de 20 carbonos o más para este propósito. Además, los autores también afirman que "la falta de nitrógeno aumentó el contenido total de ácidos grasos de *N. inconspicua*, y se produjo el mayor rendimiento de 20:5 (n-3) cuando crecieron a un nivel bajo de NaNO₃". Indicando, en contra de la presente invención, que creen que el rendimiento de EPA es el factor más importante para determinar las condiciones de crecimiento. Los autores no sugieren el método de la presente invención ya que la mayoría de sus métodos utilizan la luz como la fuente principal de energía para el cultivo.

Tampoco sugieren el éxito en los métodos que no utilizan la luz en la fuente principal de energía, ya que los autores enseñan lejos de la presente invención privando a las células de nitrógeno para aumentar el rendimiento de lípidos.

5 Barclay en los documentos de patente de EE.UU. 5130242 y 5908622 da a conocer el aislamiento, el crecimiento heterotrófico y los perfiles de ácidos grasos de varias cepas de algas (no diatomeas). El autor enseña que "si se desea un producto significativamente más alto en lípidos y ácidos grasos altamente insaturados omega-3, el cultivo se puede manipular para que sea limitado en nutrientes, preferiblemente, limitado en nitrógeno durante un tiempo adecuado...", por lo tanto, enseña directamente lejos de la invención. Además, el autor considera la purificación de los ácidos grasos omega-3 como un grupo, pero no considera la purificación de los ácidos grasos individuales. Mientras que observa
10 que los ácidos grasos omega-6, incluido el ARA, son desventajosos para propósitos dietéticos, el autor afirma que "también se pueden aislar cepas que tienen menos del 1% (como % de ácidos grasos totales) de los HUFA C20:4n-6 y C22:5n-6 indeseables para algunas aplicaciones", que indica que este autor considera que la cantidad total en lugar de la cantidad relativa de ARA es importante en contra de la presente invención. El autor no sugiere el método de la presente invención, ya que el método utiliza un cultivo de algas sin diatomeas. Tampoco sugieren el éxito en los
15 cultivos de diatomeas, ya que el autor enseña lejos de la presente invención, privando a las células de nutrientes para aumentar el rendimiento de lípidos.

Ningún otro autor ha proporcionado métodos por los cuales se puede obtener EPA en diatomeas que han crecido de forma heterotrófica en una relación suficientemente alta de EPA respecto de ARA para que sea susceptible de concentración y purificación.

20 Además, ningún otro autor ha enseñado que los métodos para producir diatomeas cultivadas deben comprender evitar la limitación de nitrógeno y mantener una concentración mínima de silicato en el cultivo, preferiblemente mediante el uso de los intervalos prescritos para las relaciones de componentes de nutrientes como se describe en la presente memoria, por lo que se puede obtener una relación suficientemente alta de EPA respecto de ARA.

Mientras que los métodos que involucran el cultivo heterotrófico de microorganismos, y en particular las diatomeas eucariotas de origen natural, pueden proporcionar una fuente alternativa de ácidos grasos omega-3 al pescado mediante la acumulación de grandes cantidades de EPA en el cultivo, puede parecer sorprendente que se haya dedicado relativamente poco o ningún esfuerzo sistemático al desarrollo de tales fuentes de EPA que al mismo tiempo están suficientemente libres de moléculas similares fisiológicamente o estructuralmente a las de EPA para permitir un alto grado de concentración y purificación. De hecho, la metodología actual enfatiza la maximización de la cantidad absoluta de EPA y, al hacerlo, con frecuencia aumenta de manera desproporcionada la cantidad absoluta de moléculas similares fisiológicamente o estructuralmente y, por lo tanto, dificulta la purificación de EPA.

Por lo tanto, en un aspecto amplio, la invención proporciona un método para obtener las composiciones como se describió anteriormente, en donde el método emplea un cultivo de microorganismos de un tipo seleccionado para una capacidad de crecimiento heterotrófico, y una capacidad de producción de EPA, y un contenido relativamente bajo de moléculas fisiológicamente o estructuralmente similares a EPA; el método incluye una fase de cultivo en la que las células crecen en condiciones en las que el carbono orgánico se utiliza como fuente de energía; las condiciones incluyen preferiblemente la no limitación de nutrientes seleccionados de un rango que incluye fósforo, nitrógeno y/o silicio; dichos procedimientos se llevan a cabo para maximizar la cantidad de biomasa recuperable en la que la relación de EPA a ARA es de al menos 14:1 y al menos 1.5% p/p del peso de células secas como ácido eicosapentaenoico.
35 Sin embargo, los inventores han encontrado que aunque se prefieren niveles no limitantes de fosfato, el nivel de concentración de fosfato tiene menos efecto en la relación de EPA a ARA y EPA a ácidos grasos que se concentran simultáneamente en comparación con el efecto de los niveles de nitrógeno y/o silicato. Los niveles no limitantes (o mayores excesos) de nutrientes son muy preferidos ya que esto puede tener el efecto de aumentar sustancialmente la relación de EPA:ARA en el producto final (consulte la Figura 1, por ejemplo).

45 Son posibles diferentes modos de cultivo o fermentación. El más simple de los cuales es la fermentación por lotes en la que las células se inoculan en medios nutritivos, crecen durante un período de tiempo y después se recolectan. La fermentación por lotes alimentada es similar a la fermentación por lotes, pero difiere en que los nutrientes concentrados se suministran al cultivo durante el período de crecimiento. La fermentación continua implica la recolección continua de cultivo que comprende la biomasa y la solución nutritiva del recipiente de fermentación y su reemplazo por una solución nutritiva fresca. La velocidad de recolección en fermentación continua se elige de modo que la densidad de las células en cultivo permanezca constante. La fermentación semicontinua es similar a la fermentación continua, excepto que las recolecciones son periódicas en lugar de continuas. La fermentación continua o la fermentación semicontinua se prefieren para la producción de la biomasa microbiana de la invención, pero también se podría utilizar la fermentación por lotes o la fermentación por lotes alimentada.

55 Para la producción industrial de EPA, las tasas de rendimiento son importantes para proporcionar un método rentable. Las tasas de producción más altas se prefieren por esta razón. A pesar de que las tasas de producción por debajo de 5 mg de EPA/L/h todavía pueden ser útiles, los inventores han demostrado que se pueden alcanzar tasas de producción de más de 5 mg de EPA/L/h utilizando los métodos y procesos de la invención donde se emplean técnicas de fermentación/cultivo continuo o semicontinuo. En una opción preferida, se producen al menos 5 mg de EPA por litro de cultivo por hora. En una opción más preferida, se producen al menos 10 mg de EPA por litro de cultivo por
60 hora.

- Además de las tasas de rendimiento, el nivel de EPA (p/p) dentro de la biomasa también es importante para la aplicabilidad industrial de los procesos y métodos de la invención. En una opción más preferida, EPA forma al menos el 2% del peso de células secas de la biomasa, en una opción aún más preferida EPA forma al menos el 3% del peso de células secas de la biomasa.
- 5
- En un aspecto relacionado, la invención proporciona un método para producir mezclas de lípidos y mezclas de ácidos grasos obtenidos a partir de un cultivo como se describe previamente en esta sección, en donde las mezclas se obtienen mediante un método de recolección que incluye las etapas de:
- recolectar células del medio de cultivo;
 - 10 opcionalmente, calentar o matar las células para desnaturalizar las enzimas endógenas;
 - formar las células en una torta de biomasa;
 - opcionalmente secar la biomasa para reducir o retirar el agua;
 - 15 extraer la torta de biomasa con un disolvente lipídico no selectivo y recuperar el material extraído del disolvente como un residuo; (por ejemplo, el uso de di-metil éter cuasi-crítico es una opción, el uso de etanol es otra)
 - tratar opcionalmente el material extraído con ácidos, álcalis y/o enzimas en presencia de un alcohol o agua para formar mezclas de ésteres alquílicos de ácidos grasos o ácidos grasos y opcionalmente concentrar y purificar adicionalmente dichas mezclas para lograr un estándar de pureza requerido.
- 20 La biomasa se puede recolectar o recuperar del cultivo según muchos métodos que conocerán los expertos en la técnica. Estos incluyen la centrifugación, filtración, sedimentación y decantación. Alternativamente, todo el cultivo se puede recoger y someter a procedimientos de secado o extracción de lípidos.
- En un cuarto aspecto amplio, la invención proporciona un método para cultivar diatomeas en donde el método emplea un cultivo de diatomeas seleccionadas para una capacidad de crecimiento heterotrófico y una capacidad de producción de EPA, y un contenido relativamente bajo de moléculas fisicoquímicamente o estructuralmente similares a EPA; el método incluye una fase de cultivo en la que las células se cultivan en una solución nutritiva que comprende:
- 25 una fuente de carbono orgánico a una concentración inicial de al menos 0.5 M de carbono;
 - una o más fuentes de nitrógeno a una concentración inicial suficientemente alta para asegurar que no se produzca limitación de nitrógeno (se prefiere una relación en moles de carbono orgánico a nitrógeno no superior a 30 (mol C:mol N));
 - 30 una concentración de silicio biodisponible en cantidades suficientes para que no se produzca limitación de silicio (preferiblemente el silicio biodisponible está en forma de silicato y preferiblemente la concentración de silicato no cae por debajo de 150µM).
- En un aspecto preferido, la concentración inicial de la fuente de carbono orgánico es de 0.5 M a 10 M, de 1 M a 10 M, o de 5 M a 10 M.
- 35 En un aspecto preferido, la relación de carbono orgánico a nitrógeno es de 1 a 30, de 5 a 30, de 10 a 30, o de 15 a 30.
- En un aspecto preferido, la relación en moles de carbono orgánico a fósforo en forma de fosfato no es superior a 1250 (mol C:mol P), en un aspecto más preferido, la relación en moles no es superior a 750. Típicamente, la relación en moles es de 100 a 1250, de 250 a 1250, de 250 a 750 o de 350 a 650 (mol C:mol P).
- 40 El silicato biodisponible puede tomar la forma de un silicato de metal alcalino. Preferiblemente se utiliza metasilicato de sodio o metasilicato de potasio.
- La concentración de silicio en forma de silicato no es inferior a 150µM en ningún momento durante el cultivo, en un aspecto más preferido, la concentración no es inferior a 200µM. Normalmente, la concentración más baja es de 150µM a 1.3mM, de 200µM a 1mM, de 200µM a 750µM o de 200µM a 500µM. A pesar de que los autores han encontrado que es beneficioso que la concentración libre de silicato en el cultivo permanezca por encima de 150µM durante el cultivo, es probable que las pequeñas gotas por debajo de esta concentración no afecten en gran medida la relación de EPA a ARA obtenida. Por lo tanto, no se debería considerar que leves descensos por debajo de 150µM de la concentración de silicato se aparten de este aspecto de la invención. Como se muestra en la Tabla 7 y la Figura 1, se pueden lograr relaciones de EPA a ARA en el intervalo de 11:1 a 13:1 sin silicato libre en el cultivo. Sin embargo, por encima de una concentración de 150µM, la relación de EPA a ARA aumenta significativamente. La concentración mantenida más preferida de silicato libre en el cultivo está en el intervalo de 200-700µM, más preferida está en el intervalo de 400-600µM. Los resultados que se muestran en la Figura 1 y el Ejemplo 3, muestran un aumento
- 45
- 50

sorprendentemente alto en la relación de EPA a ARA en estos intervalos de concentración más preferidos. Este sorprendente resultado fue inesperado e indica la presencia de una interacción sinérgica entre los componentes.

5 Lo más preferiblemente, la solución nutritiva comprende una concentración inicial de fuente de carbono orgánico de 0,5 M a 10 M, una relación en moles de carbono orgánico a nitrógeno de 1 a 30, y una concentración de silicio en forma de silicato que no cae a menos de 150 μ M en cualquier momento.

En una opción, el cultivo se recolecta de forma continua o discontinua a una velocidad promedio tal que, con el tiempo, la biomasa se retira a la misma velocidad a la que crece.

10 En una opción preferida, la biomasa se produce a una velocidad tal que se producen al menos 5 mg de EPA por litro de cultivo por hora. En una opción más preferida, se producen al menos 10 mg de EPA por litro de cultivo por hora.

En otra opción preferida, EPA forma al menos el 1.5% del peso de células secas de la biomasa. En una opción más preferida, EPA forma al menos el 2% del peso de células secas de la biomasa, en una opción aún más preferida EPA forma al menos el 3% del peso de células secas de la biomasa.

15 En un aspecto relacionado, la invención proporciona un método para producir mezclas de lípidos y mezclas de ácidos grasos obtenidas a partir de un cultivo como se describió previamente en esta sección, en donde las mezclas se obtienen mediante un método de recolección que incluye las etapas de:

recolectar células del medio de cultivo;

opcionalmente, calentar o matar las células para desnaturalizar las enzimas endógenas;

formar las células en una torta de biomasa;

20 opcionalmente secar la biomasa para reducir o retirar el agua;

extraer la torta de biomasa con un disolvente lipídico no selectivo y recuperar el material extraído del disolvente como un residuo (el uso de di-metil éter cuasi-crítico es una opción, el etanol es otra opción);

opcionalmente tratar el material extraído con ácidos, álcalis y/o enzimas en presencia de un alcohol o agua para formar mezclas de ésteres alquílicos de ácidos grasos o ácidos grasos; y

25 opcionalmente, concentrar y purificar dichas mezclas para lograr un estándar de pureza requerido.

Ejemplos

Se emplearon las siguientes técnicas experimentales generales:

Determinación del peso seco de la biomasa.

30 El peso seco de la biomasa se mide utilizando un método de filtro de fibra de vidrio pesado previamente de la siguiente manera. Se extrae una muestra de 10 ml de una muestra representativa más grande tomada mientras se agita para lograr una dispersión ampliamente homogénea de células y agregados celulares. La muestra de 10 ml se coloca en un tubo de centrifuga y se hace girar a 3000 rpm en un Heraeus Sepatech Megafuge 1.0 con un rotor oscilante durante 4 minutos y el líquido se decanta dejando un sedimento celular. El sedimento celular se lava con solución salina tamponada con fosfato y se vuelve a centrifugar. Un filtro de fibra de vidrio Sartorius se lava pasando 100 ml de agua desionizada a través del filtro y después colocándolo en un horno a una temperatura 60°C durante dos horas antes de ser pesado. La muestra de 10 ml se pasa a través del filtro previamente pesado en un aparato de filtro de vacío, se lava con 50 ml de agua desionizada y después se coloca en un horno a una temperatura de 60°C durante dos horas antes de volver a pesar. La diferencia en gramos entre los pesos previos y posteriores se toman 100 veces como una medida del peso seco por litro.

40 Recolección y extracción de material lipídico.

Las células se recolectan y se lavan para retirar el exceso de medio. El equivalente húmedo de 0.75 g de peso de células secas de material celular se utiliza para producir extracto celular. El extracto celular que contiene los lípidos se puede obtener por extracción de Folch siguiendo el método de Bligh y Dyer (1959).

Análisis de ácidos grasos totales.

45 Se obtienen análisis de ácidos grasos totales de muestras de extracto celular para identificar la composición del material cultivado. La adición de un estándar interno tal como C23:0 a la reacción permite la medición del contenido total de ácidos grasos de las células. El método de producción de ácidos grasos implica una transesterificación básica con metóxido 0.5 M en metanol, seguida de una transesterificación ácida utilizando HCl seco en metanol. Los ésteres metílicos de ácidos grasos se recuperan mediante extracción con hexano y secado con sulfato de sodio antes del análisis utilizando cromatografía de gases. La muestra se procesa en una columna capilar de vidrio ID Famewax (polietilenglicol reticulado) de 30 m x 0.25 mm contenida en un Shimadzu 2010 GC mediante autoinyección. Los ácidos

grasos se identifican comparando los tiempos de retención de los picos en condiciones de funcionamiento estándar con los de estándares conocidos suministrados por Sigma Aldrich.

Cálculo de relaciones de nutrientes.

- 5 Para permitir comparaciones de medios con diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, las relaciones de nutrientes dentro de los medios se reducen a relaciones molares de los átomos constituyentes, por ejemplo, un mol de glucosa contiene 6 moles de carbono, mientras que 1 mol de ácido acético contiene solo 2 mol de carbono.

A efectos de estos cálculos, el peso molecular de la glucosa es 180.16, de manera que 100 g de glucosa contienen $6 \times 100 / 180.16$ moles de carbono.

- 10 A efectos de estos cálculos, se supone que el extracto de levadura tiene un contenido total de nitrógeno de al menos alrededor del 10% (p/p), de manera que 100 g de extracto de levadura contiene al menos alrededor de $(10/100) \times 100 / 14$ moles de nitrógeno. De manera similar, la triptona tiene un contenido de nitrógeno de al menos alrededor del 13% (p/p).

- 15 A efectos de estos cálculos, se supone que el extracto de levadura y la triptona contribuyen con una cantidad insignificante de carbono como fuente de energía.

El contenido de nitrógeno molar de nitratos y el contenido de silicio molar de silicatos se puede calcular directamente utilizando el peso molecular de cada compuesto.

Ejemplo 1

- 20 Se transfirieron 3 g (peso seco) de una cepa de *Nitzschia laevis* In1 en un fermentador de tanque agitado con un volumen de trabajo de 19.4 L. El recipiente contenía medios de crecimiento con sales y vitaminas como se detalla en la tabla 1 junto con nutrientes en concentraciones de: 30 g/L de glucosa, 1.2 g/L de extracto de levadura, 1.3 g/L de nitrato de sodio, 40 mg/L de dihidrógeno fosfato de potasio y 270 mg/L metasilicato de sodio pentahidratado.

Tabla 1: Contenido de sal y vitaminas de los medios fermentadores.

NaCl	136.9 mM
MgSO ₄ *7H ₂ O	8.9 mM
KCl	7.2 mM
CaCl ₂	0.9 mM
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ *4H ₂ O	2.2 μM
CoCl ₂ *6H ₂ O	1.0 μM
MnCl ₂ *4H ₂ O	12.6 μM
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	1.0 μM
H ₃ BO ₃	4.9 mM
ZnCl ₂	22.8 μM
FeCl ₃ *6H ₂ O	8.1 μM
Na ₂ EDTA	72.5 μM
Vitamina B12	60 mg/L
Tiamina	100 mg/L
Biotina	100 mg/L

- 25 El cultivo se aireó con un volumen de recipiente de aire estéril por minuto y se controló la agitación para dar un contenido de oxígeno disuelto de >50%. El pH se mantuvo a 8.0 mediante la adición de NaOH 0.4 N. La temperatura se mantuvo a una temperatura de 20°C mediante la circulación de agua caliente o fría a través de una camisa alrededor del recipiente del fermentador, según se requiso.

5 Adjunto al reactor había un dispositivo de sedimentación diseñado para separar los medios de las células. El cultivo se bombeó al dispositivo y las células se devolvieron al recipiente del fermentador principal, mientras que el medio gastado se puede retirar como desecho. Se añadieron medios estériles frescos de la misma composición que el medio inicial al recipiente del fermentador para mantener constante el volumen del recipiente a 19.4 L.

La cantidad de medio retirado como desecho se incrementó gradualmente durante el período de crecimiento hasta que se retiraron 19.4 L de medio durante un período de 24 horas cuando la densidad de cultivo alcanzó la densidad de recolección de alrededor de 10.5 g/L de peso seco.

10 Una vez que el cultivo alcanzó la densidad de recolección, el cultivo que contenía células de algas se purgó como material recolectado a una velocidad por la cual el peso seco del cultivo se mantuvo entre 10 y 11 g/L. El volumen de medio gastado retirado como desecho se ajustó para mantener constante el volumen total retirado del reactor por día a 19.4 L. El volumen retirado del fermentador se reemplazó con medio fresco con la misma composición que el medio inicial.

15 Se alcanzó un estado estacionario donde la densidad celular, la recolección y la composición se mantuvieron estables. La concentración de glucosa en el medio de desecho fue mayor que 5 g/L, lo que indica que las células no estaban limitadas por el carbono.

El contenido de nutrientes de la entrada de medio fresco en el recipiente se modificó para que contuviera 2.1 g/L de nitrato de sodio y 80 mg/L de dihidrógeno fosfato de potasio con todos los demás componentes que permanecieron en sus niveles anteriores.

20 El cultivo continuo se mantuvo durante 48 horas más para permitir que las células se ajustaran a los nuevos niveles de nutrientes. Durante este tiempo, la tasa de recolección requerida para mantener el mismo peso seco del cultivo aumentó aproximadamente un 25%, lo que indica que el cultivo tuvo una tasa de crecimiento mayor cuando se proporcionó un nivel más alto de nitrógeno y/o fosfato, lo que indica que el cultivo había sido previamente nitrógeno y/o fosfato limitado. La concentración de glucosa en el medio de desecho permaneció por encima de 5 g/L, lo que indica que las células no estaban nuevamente limitadas en carbono.

25 Se obtuvieron muestras estériles de biomasa de los cultivos tanto antes del cambio de nutrientes como después del cambio, y se extrajeron los lípidos de los mismos. Los perfiles de ácidos grasos y las proporciones de los componentes dentro del extracto se muestran en la tabla 2 que muestra cómo el cambio en las condiciones de cultivo ha dado como resultado una mejora en la composición respecto de la relación EPA:ARA y una mejora en la relación de EPA respecto de componentes que se concentran simultáneamente. EPA formó el 2,3% del peso de celular seco después del cambio de nutrientes.

Los aumentos adicionales en el contenido de nitrato de sodio de los medios posteriores a esta muestra no produjeron un aumento marcado en la tasa de crecimiento, lo que indica que el cultivo ya no estaba limitado por el nitrógeno.

35 Tabla 2: Porcentajes y relaciones de ácidos grasos de cultivo antes y después del cambio en las condiciones de los nutrientes. Los porcentajes de ácidos grasos presentes se dan como un porcentaje del contenido total de ácidos grasos (p/p). Nótese que, para simplificar, los ácidos grasos con 16 o menos carbonos no se han incluido en la tabla donde contribuyen con menos del 1% del total de ácidos grasos. Cuando se han omitido ácidos grasos de 18 carbonos o más de la tabla, no se han detectado. En particular, no se pudo detectar ácido juniperónico o ácido sciadónico.

	Pre cambio de nutrientes	Post cambio de nutrientes
Nombre compuesto	% de TFA (p/p)	% of TFA (p/p)
C14:0	6.37	5.57
C16:0	22.56	22.81
C16:1 n7	39.70	34.46
C16:2n4	1.49	3.57
C18:0	0.23	0.23
C18:1n9	1.82	1.41
C18:1n7	0.24	0.23

ES 2 733 134 T3

C18:2n6	1.99	1.61
C18:3n6	0.56	0.58
C18:3n3	0.11	0.12
C18:4:n3	0.75	1.37
C20:2	0.07	
C20:3n6 (DGLA)	0.12	0.09
C20:4n6 (ARA)	2.14	1.44
C20:4n3 (ETAn3)	0.16	0.24
C20:5n3 (EPA)	16.00	19.43
C22:2	0.44	0.41
C22:5n3 (DPA)	0.25	0.33
C24:0	0.69	0.75
C22:6n3 (DHA)	1.02	1.30

EPA:ARA	7.5:1	13.5:1
EPA:AG que se concentran simultáneamente	7.8:1	8.2:1

Tabla 3: Relaciones en moles de carbono a nitrógeno en medios limitantes y no limitantes de nitrógeno.

	Moles de carbono de la glucosa	Moles de N del extracto de levadura	Moles de N del nitrato de sodio	Moles totales de N	Relación en moles C:N
Antes del cambio de nutrientes.	1.0	0.00857	0.01530	0.023867	41.9:1
Después del cambio de nutrientes.	1.0	0.00857	0.02471	0.033280	30.0:1

5 Ejemplo 2

Se transfirieron 3 g (peso seco) de un cultivo de una cepa de *Nitzschia laevis* In1 a un fermentador de tanque agitado con un volumen de trabajo de 18 L. El recipiente contenía medios de crecimiento con sales y vitaminas como se detalla en la tabla 1 junto con nutrientes en concentraciones de: 30 g/L de glucosa, 1.6 g/L de extracto de levadura, 2.98 g/L de nitrato de sodio, 80 mg/L de dihidrógeno fosfato de potasio y 270 mg/L de metasilicato de sodio pentahidratado.

10 El cultivo se aireó con un volumen de recipiente de aire estéril por minuto y se controló la agitación para dar un contenido de oxígeno disuelto de >50%. El pH se mantuvo a 8.0 mediante la adición de NaOH 0.4 N. La temperatura se mantuvo a una temperatura de 20°C mediante la circulación de agua caliente o fría a través de una camisa alrededor del recipiente del fermentador, según se requirió.

15 Adjunto al reactor había un dispositivo de sedimentación diseñado para separar los medios de las células. El cultivo se bombeó al dispositivo y las células se devolvieron al recipiente del fermentador principal, mientras que el medio gastado se puede retirar como desecho. Se añadieron medios estériles frescos al recipiente del fermentador para mantener el volumen del recipiente constante en 18 L. Los medios contenían sales según la tabla 1 junto con nutrientes en concentraciones de: 30 g/L de glucosa, 1.6 g/L de extracto de levadura, 2.98 g/L nitrato de sodio, 80 mg/L de

dihidrógeno fosfato de potasio y 530 mg/L de metasilicato de sodio pentahidratado. El medio contenía una relación en moles C:N inferior a 30:1 (ver tabla 5) para evitar la limitación de nitrógeno.

5 La cantidad de medio retirado como desecho se incrementó gradualmente durante el período de crecimiento hasta que se retiraron 18 L de medio durante un período de 24 horas cuando la densidad de cultivo alcanzó la densidad de cosecha de alrededor de 10 g/L de peso seco.

10 Una vez que el cultivo alcanzó la densidad de cosecha, el cultivo que contenía células de algas se purgó durante la recolección a una tasa por la cual el peso seco del cultivo se mantuvo entre 10 y 11 g/L. El volumen de medio gastado retirado como desecho se ajustó para mantener constante el volumen total retirado del reactor por día a 18 L. El volumen retirado del fermentador se reemplazó con medio fresco con la misma composición que el medio inicial.

15 Se alcanzó un estado estacionario donde la densidad celular, la recolección y la composición se mantuvieron estables. En este punto, se recolectaron 6.1 g de peso de células secas por 24 horas por litro de cultivo. A un requerimiento de silicato de aproximadamente 325 μmol por g de peso seco, el requerimiento diario de silicato para la síntesis de biomasa fue de 1986 $\mu\text{mol L}^{-1} \text{ día}^{-1}$. La provisión de silicato fue de 2491 $\mu\text{mol L}^{-1} \text{ día}^{-1}$ dando una concentración de Si en exceso de 505 μmol . Se obtuvieron muestras estériles de biomasa del cultivo y se extrajeron los lípidos del mismo. El perfil de ácido graso y las proporciones de componentes dentro del extracto se muestran en la tabla 4. El EPA formó el 2% del peso de células secas en estas condiciones, lo que llevó a una tasa de rendimiento del EPA de 5.1 mg de EPA por litro de cultivo por hora.

20 Tabla 4: Porcentaje de ácidos grasos presentes como porcentaje del contenido total de ácidos grasos (p/p). Relaciones de ácidos grasos y porcentajes de cultivo durante el estado de equilibrio. Nótese que, para simplificar, los ácidos grasos con 16 o menos carbonos no se han incluido en la tabla donde contribuyen con menos del 1% del total de ácidos grasos. Donde se hayan omitido de la tabla los ácidos grasos de 18 carbonos o más no han sido detectados. N.D. - no detectado.

Nombre compuesto	% de TFA (p/p)
C14:0	4.78
C16:0	25.56
C16:1 n7	28.98
C16:2n4	5.48
C18:0	0.26
C18:1n9	1.10
C18:1n7	N.D.
C18:2n6	1.66
C18:3n6	0.70
C18:3n3	0.10
C18:4:n3	1.92
C20:2	0.11
C20:3n6 (DGLA)	0.11
C20:4n6 (ARA)	1.42
C20:4n3 (ETAn3)	0.27
C20:5n3 (EPA)	21.07
C22:2	0.43
C22:5n3 (DPA)	0.32
C24:0	1.13

C22:6n3 (DHA)	1.40
---------------	------

EPA:ARA	14.8:1
EPA:AG que se concentran simultáneamente	8.0:1

Tabla 5: Relación en moles de carbono a nitrógeno en los medios.

moles de carbono de la glucosa	Moles de N del extracto de levadura	Moles de N de nitrato de sodio	Moles totales N	Relación en moles C:N
1.0	0.01143	0.03506	0.04649	21.5:1

5 Ejemplo 3

Se transfirieron 3 g (peso seco) de una cepa de *Nitzschia laevis* In1 en un fermentador de tanque agitado con un volumen de trabajo de 14 L. El recipiente contenía medios de crecimiento con sales y vitaminas como se detalla en la tabla 1 junto con nutrientes en concentraciones de: 50 g/L de glucosa, 1.9 g/L de extracto de levadura, 4.0 g/L de nitrato de sodio y 170 mg/L de dihidrógeno fosfato de potasio. El metasilicato de sodio pentahidratado se añadió por separado como una solución madre concentrada a una concentración de 143 mg/L.

El cultivo se aireó con un volumen de recipiente de aire estéril por minuto y se controló la agitación para dar un contenido de oxígeno disuelto de >50%. El pH se mantuvo a 8.0 mediante la adición de NaOH 0.4 N. La temperatura se mantuvo a una temperatura de 20°C mediante la circulación de agua caliente o fría a través de una camisa alrededor del recipiente del fermentador, según se requiera.

El medio contenía una relación en moles C:N inferior a 30:1 (véase tabla 6) para evitar la limitación de nitrógeno. Todas las mediciones de los niveles en los medios recolectados confirmaron que había ≥ 80 mg/L de nitrato en el cultivo. Dado que el fermentador se rellena con medio fresco inmediatamente después de la recolección, esta medida representa la concentración de nitrato más baja en el fermentador y, por lo tanto, el nitrógeno no fue limitante en todo este ejemplo.

20 Tabla 6: Relación en moles de carbono a nitrógeno en los medios.

Moles de carbono de la glucosa	Moles de N del extracto de levadura	Moles de N de nitrato de sodio	Moles totales de N	Relación en moles C:N
1.665	0.013571	0.047064	0.060636	27.5:1

Una vez que el cultivo alcanzó la densidad de recolección, el cultivo que contenía células de algas se recolectó a intervalos de seis horas a un volumen variable, por lo que el peso seco del cultivo se mantuvo alrededor de 7.5 g/L. El volumen retirado del fermentador se reemplazó con medio fresco con el mismo contenido de glucosa, nitrato de sodio, extracto de levadura y dihidrógeno fosfato de potasio que el medio inicial.

El silicio como una solución acuosa concentrada de metasilicato de sodio se añadió independientemente de otros medios y se añadió a intervalos regulares durante todo el día en lugar de todo al momento de la recarga del medio para evitar problemas de precipitación a altas concentraciones. La frecuencia de adición de metasilicato de sodio se modificó para variar la concentración de silicio en el medio de cultivo.

30 Se tomaron muestras para el análisis de ácidos grasos a intervalos diarios y se calculó la relación EPA:ARA dentro de la biomasa.

Los niveles de metasilicato de sodio disponibles en el fermentador se calcularon tomando los niveles de silicato residual, sumando la cantidad de silicato añadido, restando la cantidad incorporada a la biomasa (a 325 μmol de silicio por gramo de peso seco) y compensando la dilución causada cuando el fermentador se recolectó y relleno con medios libres de silicatos.

5 Los resultados que se muestran en la tabla 7 y la Figura 1 muestran una fuerte correlación entre el silicato disponible y la relación EPA:ARA con EPA:ARA residual por debajo de 14:1 en todos los casos en que los niveles de silicato en el cultivo se limitaron (es decir, cayeron a cero). Sorprendentemente, no se observó una relación mayor que 14:1 hasta que el nivel mínimo de metasilicato de sodio estaba por encima de 150 μM .

Para todas las muestras donde se tomaron las mediciones (muestras 3 a 11 en la tabla 7), el EPA formó al menos el 3% del peso seco de la biomasa.

Tabla 7: Relaciones EPA:ARA en la biomasa formada en medios con diferentes concentraciones mínimas de metasilicato de sodio.

Ejemplo	Concentración mínima de metasilicato de sodio (μM)	Relación EPA:ARA
1	213	14.3:1
2	0	13.0:1
3	0	12.2:1
4	0	11.6:1
5	142	12.9:1
6	193	14.1:1
7	569	20.1:1
8	690	19.0:1
9	507	21.6:1
10	476	23.6:1
11	496	22.6:1

10

Ejemplo 4

La biomasa se produjo según el método anterior y los lípidos se extrajeron de la biomasa liofilizada. Los lípidos se convirtieron en ácidos grasos libres utilizando KOH en etanol:agua 2:1, se secaron para retirar el agua y después se convirtieron en ésteres etílicos utilizando H_2SO_4 en etanol.

15 Los ésteres etílicos resultantes se concentraron según los métodos descritos por W.B. Nilsson ("*Supercritical Fluid Technology in Oil and Lipid Chemistry*", Editores J.W. King & G.R., AOCS Press, ISBN0-935315-T1-3, 1996, pp. 180-212). Las concentraciones de ácidos grasos con 20 carbonos o más antes y después de la concentración se muestran en la tabla 8.

20 Nótese que, mientras las proporciones relativas de cada uno de estos ácidos grasos han aumentado varias veces, la relación de EPA a ARA solo ha cambiado ligeramente, lo que demuestra la ventaja de generar material de partida con una alta relación de EPA a ARA.

Tabla 8: Ácidos grasos con 20 carbonos o más antes y después de la concentración.

Ácido graso	Proporción de ácidos grasos totales antes de la concentración (%)	Proporción de ácidos grasos totales después de la concentración (%)
C20:3 n-6	<0.1	<0.1
C20:4 n-6 (ARA)	1.74	3.85
C20:4 n-3	1.45	3.15
C20:5 n-3 (EPA)	26.74	71.0
C22:5 n-3	0.51	1.35
C24:0	<0.1	<0.1

C22:6 n-3	1.98	7.4
EPA:ARA	15.4:1	18.4:1

Ejemplo 5

5 *Mortierella renispora*, un hongo del género *Mortierella*, se cultiva de forma heterotrófica en condiciones elegidas para producir biomasa con una composición de ácidos grasos que comprende una relación de EPA a ARA de aproximadamente 11:1 o más y una relación de EPA a ácidos grasos totales que se concentran simultáneamente de aproximadamente de 8:1 o más. Se recolecta la biomasa y se extraen los lípidos. Los lípidos extraídos son transesterificados para formar ésteres etílicos. Los ésteres etílicos se procesan después para producir un concentrado de éster etílico de ácido graso en el que el EPA forma al menos el 60% del total de ácidos grasos en peso, y este concentrado se purifica después para producir un éster etílico de EPA de más del 90% de pureza.

Ejemplo 6

15 *Chlorella minutissima*, un alga del género *Chlorella*, se cultiva de forma heterotrófica en condiciones elegidas para producir biomasa con una composición de ácidos grasos que comprende una relación de EPA a ARA de aproximadamente 11:1 o más y una relación de EPA a ácidos grasos totales que se concentran simultáneamente de aproximadamente 8:1 o más. Se recolecta la biomasa y se extraen los lípidos. Los lípidos extraídos son transesterificados para formar ésteres etílicos. Los ésteres etílicos se procesan después para producir un concentrado de éster etílico de ácido graso en el que el EPA forma al menos el 60% del total de ácidos grasos en peso, y este concentrado se purifica después para producir un éster etílico de EPA de más del 90% de pureza.

Ejemplo 7

20 *Nannochloropsis oceanica*, un alga del género *Nannochloropsis*, se cultiva de forma heterotrófica en condiciones elegidas para producir biomasa con una composición de ácidos grasos que comprende una relación de EPA a ARA de aproximadamente 11:1 o más y una relación de EPA a ácidos grasos totales que se concentran simultáneamente de aproximadamente 8:1 o más. Se recolecta la biomasa y se extraen los lípidos. Los lípidos extraídos son transesterificados para formar ésteres etílicos. Los ésteres etílicos se procesan después para producir un concentrado de éster etílico de ácido graso en el que el EPA forma al menos el 60% del total de ácidos grasos en peso, y este concentrado se purifica después para producir un éster etílico de EPA de más del 90% de pureza.

Ejemplo 8

30 Se lleva a cabo una pantalla después del método de Barclay (US 5130242) para identificar un *Thraustochytrid sp.* en el que el nivel de EPA como porcentaje del total de ácidos grasos es alto en relación con la proporción de ARA y ácidos grasos que se concentran simultáneamente. El microorganismo crece después en condiciones heterotróficas elegidas para producir biomasa con una composición de ácidos grasos que comprende una relación de EPA a ARA de aproximadamente 11:1 o más y una relación de EPA a ácidos grasos totales que se concentran simultáneamente de aproximadamente 8:1 o más. Se recolecta la biomasa y se extraen los lípidos. Los lípidos extraídos son transesterificados para formar ésteres etílicos. Los ésteres etílicos se procesan después para producir un concentrado de éster etílico de ácido graso en el que el EPA forma al menos el 60% del total de ácidos grasos en peso, y este concentrado se purifica después para producir un éster etílico de EPA de más del 90% de pureza.

Ejemplo 9

40 *Cyclotella cryptica*, una diatomea, se cultiva de forma heterotrófica en condiciones elegidas para producir biomasa con una composición de ácidos grasos que comprende una relación de EPA a ARA de aproximadamente 14:1 o más. Se recolecta la biomasa y se extraen los lípidos. Los lípidos extraídos son transesterificados para formar ésteres etílicos. Los ésteres etílicos se procesan después para producir un concentrado de éster etílico de ácido graso en el que el EPA forma al menos el 60% del total de ácidos grasos en peso, y este concentrado se purifica después para producir un éster etílico de EPA de más del 90% de pureza.

Ejemplo 10

45 *Phaeodactylum tricorutum*, una diatomea que es un fotoautótrofo obligatorio, se transforma según el método de Apt *et al.* (documento de patente de EE.UU. 7939710) para darle la capacidad de crecer de forma heterotrófica utilizando glucosa como fuente de energía y carbono. El organismo transformado se cultiva de forma heterotrófica en condiciones elegidas para producir biomasa con una composición de ácidos grasos que comprende una relación de EPA a ARA de aproximadamente 14:1 o más. Se recolecta la biomasa y se extraen los lípidos. Los lípidos extraídos son transesterificados para formar ésteres etílicos. Los ésteres etílicos se procesan después para producir un concentrado

50

de éster etílico de ácido graso en el que el EPA forma al menos el 60% del total de ácidos grasos en peso, y este concentrado se purifica después para producir un éster etílico de EPA de más del 90% de pureza.

General

- 5 Por lo tanto, los ejemplos muestran composiciones (que incluyen composiciones de biomasa microbiana y ácidos grasos) que contienen en la región de (o mayor que) 20% de EPA en peso de ácidos grasos totales, con una relación de EPA a ARA de 11:1 o mayor, y con una relación de EPA a ácidos grasos que se concentran simultáneamente de 8:1 o más. También se ha demostrado que las composiciones se pueden purificar a más de 70% de EPA en peso de ácidos grasos totales, mientras que al menos conservan la relación de EPA a ARA en la composición.
- 10 A menos que el contexto claramente requiera lo contrario, a lo largo de la descripción y las reivindicaciones, las palabras "comprende", "que comprende", y similares, se deben interpretar en un sentido inclusivo en lugar de un sentido exclusivo o exhaustivo, es decir, en el sentido de "que incluye, pero no se limita a".

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una diatomea cultivada de forma heterotrófica que comprende ácido eicosapentaenoico y ácido araquidónico en una relación de al menos 17:1, donde el ácido eicosapentaenoico forma al menos el 1.5% p/p del peso seco de la diatomea y la diatomea es *Nitzschia laevis*.
2. Un método para producir una diatomea que comprende ácido eicosapentaenoico y ácido araquidónico en una relación de al menos 14:1 y al menos el 1.5% p/p del peso de células secas como ácido eicosapentaenoico que comprende:
 - 10 a. cultivar diatomeas en cultivos heterotróficos que contienen una solución nutritiva que comprende:
 - (i) una fuente de carbono orgánico a una concentración inicial de al menos 0.5 M de carbono
 - (ii) una relación en moles de carbono orgánico a nitrógeno de no más de 30:1 (mol C:mol N) y;
 - (iii) una fuente no limitante de silicato que no cae por debajo de 150 µM; y
 - b. recuperar la diatomea del cultivo heterotrófico.
3. El método de la reivindicación 2 en donde las diatomeas se cultivan en cultivo heterotrófico en un fermentador.
- 15 4. El método de la reivindicación 3 en donde el cultivo comprende fermentación continua.
5. El método de la reivindicación 2 en donde las diatomeas comprenden especies *Nitzschia*.
6. El método de la reivindicación 2 en donde dicha fuente de carbono comprende glucosa.
7. El método de la reivindicación 2 en donde dicha fuente de carbono se selecciona entre glucosa, almidón hidrolizado o de suero de leche hidrolizada.
- 20 8. El método de la reivindicación 2 en donde dicha fuente de nitrógeno está en la forma de nitrato de sodio o nitrato de potasio.
9. El método de la reivindicación 2 en donde dicha fuente de nitrógeno se enriquece con una fuente de aminoácido.
10. El método de la reivindicación 2 en donde dicho silicato está en forma de sodio o metasilicato de potasio.
- 25 11. El método de la reivindicación 2 en donde la solución de nutrientes comprende fósforo en forma de fosfato.
12. El método de la reivindicación 11, en donde la relación en moles de carbono orgánico a fósforo en forma de fosfato no es superior a 1250:1 (mol C:mol P).

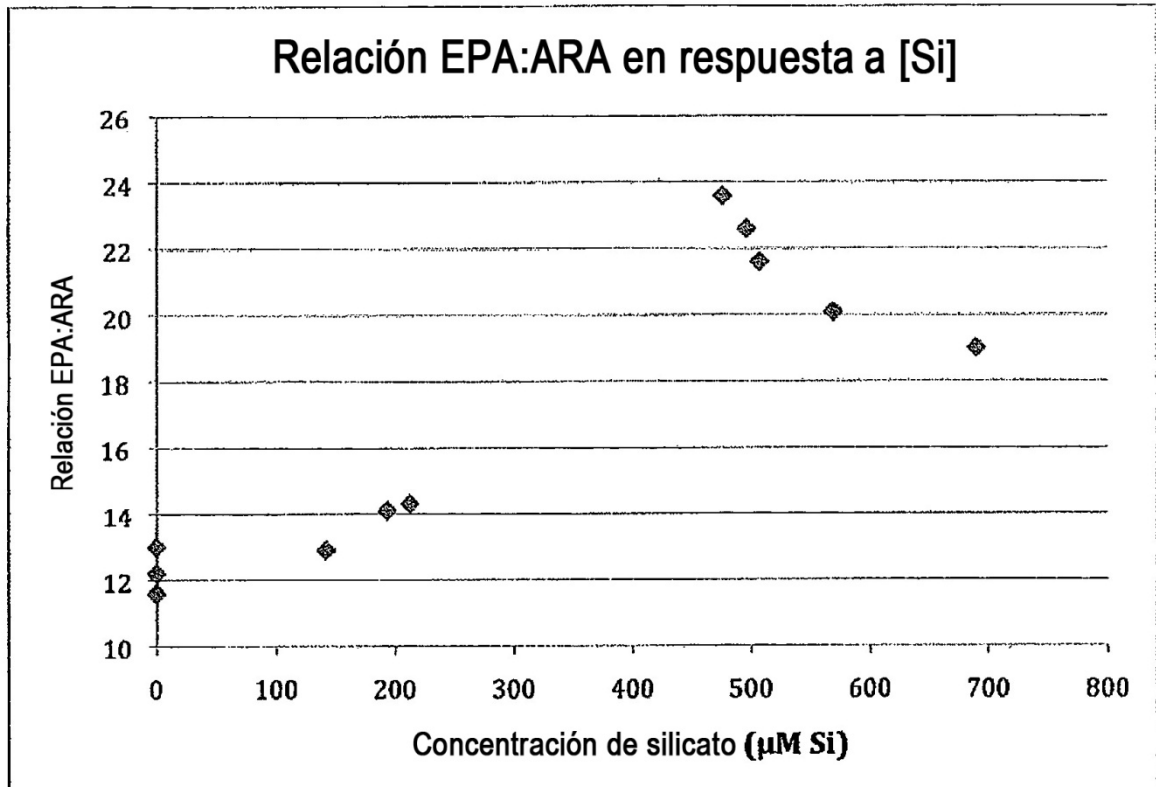


FIGURA 1