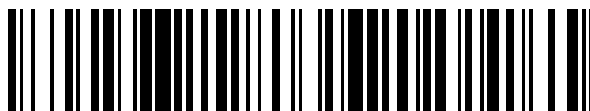


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 738 672**

51 Int. Cl.:

C12P 7/64

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2014 PCT/FR2014/053430**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015 WO15092301**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2014 E 14830829 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 3083973**

54 Título: **Procedimiento de enriquecimiento en DHA de la biomasa de microalgas del género Traustochytrium**

30 Prioridad:

19.12.2013 FR 1362962

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

24.01.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

CAULIER, BERNARD

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 738 672 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de enriquecimiento en DHA de la biomasa de microalgas del género *Traustochytrium*

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

Los lípidos constituyen una de las tres grandes familias de macronutrientes con las proteínas y los glúcidos.

Entre los lípidos, se distinguen especialmente los triglicéridos y los fosfolípidos:

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

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

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

Los fosfolípidos son unos lípidos de estructura ya que son constituyentes de las membranas celulares de las que aseguran, entre otras cosas, la fluidez.

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

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

Desde el punto de vista fisiológico, se distinguen:

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

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

- los ácidos grasos no indispensables.

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

Los otros ácidos grasos se denominan no esenciales.

Entre los ácidos grasos no indispensables, se encuentra especialmente:

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

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

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

Los ácidos grasos poliinsaturados

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ácidos grasos saturados

- 15 Entre los ácidos grasos saturados, el ácido palmítico, también denominado ácido hexadecanoico o ácido cetílico, es uno de los ácidos grasos saturados de C16:0 más habituales en los animales y las plantas.

El ácido palmítico es el primer ácido graso producido durante la lipogénesis; a partir de él, se pueden producir unos ácidos grasos más largos.

Además, es el ácido graso utilizado preferiblemente para sintetizar ATP. El resultado energético de su combustión indica 129 ATP. Constituye así un excelente alimento energético.

- 20 Industrialmente, se utiliza también el ácido palmítico para la fabricación tanto de las margarinas como de los jabones duros.

- 25 En el campo de las pinturas, dado que está saturado, el ácido palmítico no puede polimerizarse ni rigidificarse una vez que entra en contacto con el oxígeno del aire (a diferencia del ácido oleico, linoleico y linolénico). Permanece, por lo tanto, en su forma de sólido blando y actúa (con el ácido esteárico) como plastificante de los aglutinantes oleosos polimerizados. Así, con el ácido esteárico, asegura la elasticidad necesaria para la buena conservación de las materias pictóricas al óleo a lo largo del tiempo.

Ácidos grasos monoinsaturados

Como precursor de ácido graso monoinsaturado, el ácido palmítico conduce al ácido palmitoleico (16:1 n-7), naturalmente presente en una gran cantidad en la fruta o la pulpa de espino amarillo.

- 30 Por otro lado, se ha descrito que una aportación incrementada de ácido palmitoleico en la alimentación podría tener unos efectos hipocolesterolémicos e hipogliceridémicos, reducir los riesgos de accidente vascular cerebral, y mejorar también el metabolismo de las células musculares lisas vasculares.

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

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

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

- 40 Para conseguir este resultado, se han trabajado mucho primeros procedimientos de fermentación que permiten obtener altas densidades celulares (acrónimo inglés: HCD por *High-Cell-Density*), a fin de obtener unos rendimientos y productividades máximas en lípidos.

El objetivo de estos cultivos HCD era la obtención de la concentración la más elevada posible de los lípidos deseados en el lapso de tiempo más corto.

- 45 Sin embargo, se hizo evidente rápidamente para los especialistas del campo que es necesario, por ejemplo, someter las microalgas a un estrés nutricional que limite su crecimiento cuando se desea hacerlas producir importantes reservas lipídicas.

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

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

5 Se reivindica más particularmente un procedimiento para la producción de lípidos microbianos, que comprende las etapas que consisten en:

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

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

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

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

15 En la microalga *Schizochytrium sp* cepa ATCC 20888, se procede así más particularmente a una primera fase de crecimiento en presencia de una fuente carbonada y de una fuente nitrogenada, pero sin limitación en oxígeno, a fin de favorecer la obtención de una alta densidad celular y después, en una segunda fase, parar el suministro de nitrógeno y ralentizar progresivamente la aportación de oxígeno (gestión de la presión en oxígeno disuelto o pO₂ del 10% al 4% y después al 0,5%), a fin de estresar la microalga, ralentizar su crecimiento e iniciar la producción de los
20 ácidos grasos de interés.

En la microalga *Cryptocodinium conhii*, el contenido más elevado en DHA se obtiene a baja concentración de glucosa (del orden de 5 g/l), y así a bajo porcentaje de crecimiento (Jiang y Chen, 2000, Process Biochem., 35(10) 1205-1209).

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

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

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

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

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

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

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

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

45 Sea como sea, las preparaciones comerciales de biomasa de microalgas ricas en DHA y de ácido palmítico están disponibles gracias a la utilización de condiciones de fermentación estándar.

Sin embargo, sigue habiendo una necesidad no satisfecha de disponer de un procedimiento alternativo de producción de biomasa de microalgas de calidad, con alto contenido de DHA y con contenido controlado en ácido palmítico y/o ácido palmítico.

50 Resumen de la invención

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de producción de una biomasa de microalgas del género *Traustochytrium* enriquecida en ácido docosahexaenoico (DHA), caracterizado por que, durante la fase de cultivo en condiciones heterotróficas, la aportación de oxígeno se controla para satisfacer únicamente las necesidades en oxígeno 1) para la producción de energía necesaria para el mantenimiento celular, 2) para la producción de lípidos de base, y 3) para el crecimiento de la biomasa excluyendo los ácidos grasos, y por que la aportación de oxígeno necesaria para satisfacer únicamente las necesidades 1), 2) y 3) se calcula mediante la ecuación 2 siguiente

$$qO_2Diana = (qm \times \frac{6x^{32}}{180}) + (qlípidosdebase \times y^{O_2/lípidos}) + (\mu \times \gamma^{O_2/x})$$

en la que

qO_2Diana es la cantidad de oxígeno en gramo por gramo de biomasa excluyendo los ácidos grasos y por hora;

10 qm es el coeficiente de mantenimiento expresado en g de glucosa por g de biomasa excluyendo los ácidos grasos y por hora;

$qlípidosdebase$ es la velocidad de acumulación de los lípidos de base expresada en g de lípidos de base por g de biomasa excluyendo los ácidos grasos y por hora;

15 $y^{O_2/lípidos}$ es el coeficiente de consumo de oxígeno con relación a la formación de lípidos expresado en g de oxígeno por g de lípidos,

μ es la velocidad de crecimiento expresada en g de biomasa excluyendo los ácidos grasos formada por g de biomasa excluyendo los ácidos grasos y por hora, es decir (h^{-1});

$\gamma^{O_2/x}$ es el coeficiente de consumo de oxígeno con respecto a la formación de biomasa excluyendo los ácidos grasos expresado en g de oxígeno por g de biomasa excluyendo los ácidos grasos.

20 Facultativamente, no se aplica ninguna limitación de un elemento nutritivo, especialmente en fuente carbonada o nitrogenada, durante el procedimiento de fermentación.

Facultativamente, las fases de crecimiento y de producción de DHA son concomitantes.

25 Preferentemente, las microalgas son del género *Schizochytrium sp* o *Schizochytrium mangrovei*. De manera más específica, las microalgas pueden ser una cepa seleccionada entre las cepas CNCM I-4469 y CNCM I-4702 depositadas en la colección Nacional de Cultivos de Microorganismos del Instituto Pasteur, respectivamente el 14 de abril de 2011 y el 22 de noviembre de 2012.

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

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

- como mínimo un 40% de DHA en peso de ácidos grasos totales; y/o
- como máximo un 40% de ácido palmítico en peso de ácidos grasos totales; y/o
- como mínimo 25% de ácidos grasos en seco/peso de biomasa.

Descripción detallada de la invención

35 En el ámbito de la invención, la compañía solicitante ha elegido explorar una vía original de optimización de la producción en DHA proponiendo una solución alternativa a las clásicamente consideradas por el experto en la materia.

40 La compañía solicitante ha encontrado así, lo que va en contra de los prejuicios técnicos en la materia, que es posible producir por fermentación unas biomásas de microalgas ricas en lípidos (más del 45% en peso seco de biomasa) de los cuales los ácidos grasos preponderantes son el ácido docosahexaenoico (DHA), modulando al mismo tiempo o controlando la cantidad de ácido palmítico y de ácido palmítoleico:

- sin que sea necesario desvincular la fase de crecimiento de la microalga y la fase de producción de los lípidos – por el contrario, la producción de lípidos es concomitante al crecimiento celular y se realiza por lo tanto en una sola fase,
- sin que sea indispensable, como se describe en el estado de la técnica, inducir a una limitación de nitrógeno o de cualquier otro elemento nutritivo, y

45 - sin que sea tampoco indispensable controlar la fermentación por la pO_2 .

La compañía solicitante ha encontrado así que se puede controlar la composición en lípidos de la biomasa, y especialmente las proporciones de DHA y de ácido palmítico y palmitoleico gracias a un control de la oxigenación del medio de fermentación.

5 En efecto, la compañía solicitante ha entendido que el oxígeno se utiliza por las microalgas según las prioridades siguientes:

- producción de energía para el mantenimiento,
- producción de un surtido de ácidos grasos, denominados lípidos de base, de los cuales el DHA es mayoritario,
- crecimiento de la biomasa excluyendo los ácidos grasos, y
- producción de ácido palmítico con el excedente de oxígeno.

10 En otras palabras, el procedimiento conforme a la invención consiste en satisfacer las necesidades en oxígeno que corresponden a los tres primeros puntos y así aportar la cantidad de oxígeno óptima para obtener una biomasa rica en DHA (ya sea producida por *Schizochytrium sp* o *S. mangrovei*).

15 Después, como se demostrará en la parte experimental siguiente, se puede realizar una aportación de oxígeno suplementario y conducir a una sobreproducción rápida de ácido palmítico (bien ilustrado con *S. mangrovei*), con o sin ácido palmitoleico (bien ilustrado con *Schizochytrium sp*).

La compañía solicitante ha empezado sus trabajos en base a la cepa *Schizochytrium sp* ATCC 20888.

20 Siguiendo las enseñanzas del estado de la técnica, especialmente las de la solicitud de patente WO 01/54510, la compañía solicitante ha encontrado, en primer lugar, que, contrariamente a lo que se divulga, una regulación constante de la pO_2 al 0% o a más del 10% durante todo el tiempo de la fermentación permitía producir más del 35% de AGPI en los ácidos grasos (más del 25% de DHA en ácidos grasos totales), al igual que con un comportamiento razonado con una reducción de la pO_2 en cascada (un 10%, después un 4%, después un 0,5% de saturación).

25 Por el contrario, este último comportamiento (según la solicitud WO 01/54510) aplicado a la cepa CNCM I-4702 lleva finalmente a la producción de ácidos grasos, de los cuales el ácido palmítico es muy predominante en más del 60%, mientras que el DHA no alcanza el 20%; este comportamiento lleva a los mismos resultados que los obtenidos para esta cepa con un comportamiento a pO_2 a 10% constante.

Además, desde un punto de vista técnico, la medición de la pO_2 plantea grandes dificultades cuando se trata de trasladar el protocolo del laboratorio a escala industrial (en otras palabras, pasar de la escala de los fermentadores de 2 a 20 l a escala de reactores de 1 a 200 m³).

30 En efecto, la pO_2 se define como la concentración relativa de oxígeno disuelto en el mosto de fermentación de saturación. Por ejemplo, si el agua se pone en aireación bajo aire, a temperatura ambiente y presión atmosférica, suficientemente tiempo, se considera que la pO_2 es igual al 100% (lo que corresponde al estado de la oxigenación del fermentador a $t = 0$). Ahora bien, durante el calibrado de una sonda pO_2 en un fermentador, el contenido de oxígeno disuelto está influenciado por la concentración de sales residuales y por la temperatura de fermentación.

35 Por otro lado, se admite clásicamente que, para un fermentador de laboratorio, la pO_2 está poco influenciada por la presión generada por la altura del mosto de fermentación y por los efectos de mezcla. Sin embargo, durante industrializaciones sobre fermentadores de media (del orden del m³) hasta gran capacidad (del orden de un centenar de m³), la altura del mosto de fermentación va, por el contrario, a:

- tener una influencia sobre la presión en oxígeno disuelto; y
- provocar unos fenómenos complejos en el fermentador "no perfectamente agitado".

40 En este sentido, el valor de pO_2 establecido a escala del laboratorio no es por lo tanto extrapolable a escala industrial.

45 Además, las recomendaciones de la patente WO 01/54510 descritas para *Schizochytrium sp* no parecen generalizables a todas las cepas del género *Thraustochytrium*. En otras palabras, en la presente invención, no se procede aquí a una disminución de la aportación de oxígeno a fin de "estresar" la microalga para hacerla producir sus lípidos de reserva (en este caso el DHA), sino a controlar la aportación de oxígeno a la altura de las necesidades expresadas por dicha microalga para modular la orientación de su producción de lípidos y, eso sin referirse a la pO_2 .

Por otro lado, la elección del comportamiento de fermentación controlando la aportación de oxígeno ha llevado a la compañía solicitante a obtener, sin que sea útil limitar la aportación de ciertas sustancias nutritivas ni desvincular la fase de crecimiento y de producción, resultados destacables:

- un aumento del contenido global de lípidos de interés, y especialmente del DHA, y

- una reducción de los olores (la reducción del olor particularmente intenso de las biomásas recogidas de la CNCM I-4469 es destacable).

Elección de los microorganismos

5 Las cepas a utilizar en los métodos de la presente invención son del género *Thraustochytrium*, más particularmente *Schizochytrium sp* o *Schizochytrium mangrovei*. Tales cepas son conocidas por el experto en la materia. Por ejemplo, se puede citar la cepa *Schizochytrium sp* ATCC nº 20888, descrita y estudiada en la solicitud WO 01/54510.

La compañía solicitante ha identificado durante sus búsquedas varias cepas de microalgas productoras de DHA de gran interés. En particular, la compañía solicitante está muy particularmente interesada por dos cepas que ha identificado.

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

```

1   GAGGGTTTTA CATTGCTCTC aTTCCaATAG CAaGACGCGA AGCGCCCCGC ATTGATATTT
61  CTCGTCACCTA CCTCGTGGAG TCCACATTGG GTAATTACG CGCCTGCTGC CTTCCITGGA
121 TGTGGTAGCC GTCTCTCAGG CTCCTCTCC GGAGTCGAGC CCTAACTCCC CGTCACCCGT
181 TATAGTCACC GIAGGCCAAT ACCCTACCGT CGACAACCTGA TGGGGCAGAA ACTCAAACGA
241 TTCATCGCTC CGAAAAGCGA TCTGCTCAAT TATCATGACT CACCAAGAGA GTTGGCTTAG
301 ACCTAATAAG TCGGGCCCTC CCCGAAAGTC GGGCCCGTAC AGCACGTATT AATTCAGAA
361 TIACTGCAGG TATCCGTATA AAGGAACTAC CGAAGGGATT ATAACCTGATA TAATGAGCCG
421 TTCGAGTTT CACAGTATAA TTCGCTTATA CTTACACATG CATGGCTTAG TCTTTGAGA
    
```

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

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

```

1   GGTTTTACAT TGCTCTCATT CCGATAGCAA AACGCATACA CGCTTCGCAT CGATATTTCT
61  CGTCTACCT CGTGGAGTCC ACAGTGGGTA ATTTACGCGC CTGCTGCTAT CCTTGGATAT
121 GGTAGCCGTC TCTCAGGCTC CCTCTCCGGA GTCGAGCCCT AACTCTCCGT CACCCGTTAT
181 AGTCACCGTA GTCCAATACA CTACCGTCGA CAACTGATGG GGCAGAACT CAAACGATTC
241 ATCGACAAA AWAGTCAATC TGCTCAATTA TCATGATTCA CCAATAAAAT CGGCTTCAAT
301 CTAATAAGTG CAGCCCATA CAGGGCTCTT ACAGCATGTA TTATTTCCAG AATTACTGCA
361 GGTATCCATA TAAAAGAAAC TACCGAAGAA ATTATTACTG ATATAATGAG CCGTTCCGAG
421 TCTCACAGTA CAATCGCTTA TACTTACACA GCAG
    
```

25 lo que ha permitido identificarlo como siendo una cepa del tipo *Schizochytrium mangrovei*. Esta cepa se designará "CNCM I-4702" posteriormente en la presente solicitud.

Determinación y utilización de la cantidad de oxígeno necesaria, en particular qO₂

El flujo de oxígeno global introducido en el medio de cultivo es modulable y depende esencialmente:

- del caudal del aire introducido,
- de la velocidad de agitación que favorece la disolución del oxígeno en el medio.

30 Este flujo se denomina OTR (acrónimo inglés por Oxygen Transfer Rate o Porcentaje de transferencia de oxígeno).

El consumo de oxígeno por el cultivo se denomina OUR (acrónimo inglés por Oxugen Uptake Rate o Porcentaje de consumo de oxígeno).

Cuando la biomasa crece en el fermentador, su consumo global en oxígeno aumenta hasta absorber todo el oxígeno transferido, el OUR se considera entonces como igual al OTR.

El OTR y el OUR son unos datos para el conjunto del medio de cultivo. Así, el OUR para un volumen de cultivo puede referirse a la cantidad de células que ocupan este volumen.

- 5 Así, el consumo celular se denomina qO_2 y representa la cantidad de O_2 en gramo absorbido por gramo de célula y por hora. Este consumo se calcula entonces para la masa de células como tal, es decir sin la masa de los ácidos grasos, ya que las reservas lipídicas no tienen un papel activo en la absorción del oxígeno.

10 El procedimiento de la invención permite, por una aportación controlada en medio de cultivo, actuar sobre la producción de los lípidos y optimizarlo en función de las condiciones de crecimiento de las microalgas (tamaño del inóculo, edad del cultivo, etc.).

El consumo de O_2 global corresponde a la adición de las diferentes utilidades del oxígeno por la célula.

La compañía solicitante distingue cuatro vías de consumo del oxígeno, que corresponden a las necesidades elementales de la célula, necesidades satisfechas sucesivamente con un orden de prioridad a altura de la aportación de oxígeno.

- 15 Estas necesidades son las siguientes, por orden de prioridad:

1. Mantenimiento celular.
2. Producción de lípidos de base
3. Formación de la biomasa excluyendo el ácido graso.
4. Acumulación de lípidos relacionados con un desbordamiento metabólico.

- 20 La compañía solicitante ha encontrado que el qO_2 se determina entonces por la fórmula siguiente:

Ecuación (1)

$$qO_2 = (qm \times \frac{6 \times 32}{180}) + (q_{\text{lípidos de base}} \times \gamma^{O_2/\text{lípidos}}) + (\mu \times \gamma^{O_2/x}) + (q_{\text{lípidos del desbordamiento}} \times \gamma^{O_2/\text{lípidos}})$$

(1) (2) (3) (4)

- 25 Los términos “qm”, “ $q_{\text{lípidos de base}}$ ”, “ $\gamma^{O_2/\text{lípidos}}$ ”, “ μ ”, “ $\gamma^{O_2/x}$ ” y “ $q_{\text{lípidos de desbordamiento}}$ ” de la ecuación deben entenderse de la manera siguiente.

Mantenimiento celular. Término (1) de la ecuación

El mantenimiento celular corresponde a la energía que necesita la célula para su conservación, independientemente de cualquier producción de lípidos o de crecimiento de biomasa.

- 30 El “qm” es la cantidad de sustrato carbonado (la glucosa generalmente) utilizada para producir esta energía; se expresa en g de glucosa por g de biomasa excluyendo los ácidos grasos y por hora. Este término se designa clásicamente en el campo como la energía de mantenimiento o coeficiente de mantenimiento.

La necesidad en oxígeno asociado es proporcional. En efecto, se necesitan 6 moléculas de O_2 (Masa Molar: 32 g) para transformar una molécula de glucosa (Masa Molar: 180 g). Dando como resultado el término “ $qm \times \frac{6 \times 32}{180}$ ” en la ecuación (1).

- 35 Producción de lípidos de base. Término (2) de la ecuación

La compañía solicitante ha constatado que la acumulación de lípidos es concomitante al crecimiento y no es únicamente un fenómeno que aparece a la parada de esta última. Una acumulación de lípidos es precursor del crecimiento, aunque sea sólo para la formación de las membranas celulares.

- 40 La composición de estos lípidos de base es diferente en función de la cepa y comprende, entre otros, ácido palmítico o ácido palmitoleico como precursores de la biosíntesis de DHA, pero el DHA es siempre el constituyente mayoritario, cuya cuantificación se ilustra mediante el ejemplo 2.

La velocidad de acumulación de estos lípidos corresponde a un flujo denominado “ $q_{\text{lípidos de base}}$ ” en la ecuación (1).

Para las cepas CNCM I-4469 *Schizochytrium sp* y CNCM I-4702 *Schizochytrium mangrovei*, esta velocidad se ejemplifica a continuación.

Para obtener la necesidad en oxígeno asociado, se multiplica este flujo o velocidad por la necesidad en oxígeno para formar unos lípidos (también denominado coeficiente de consumo de oxígeno con respecto a la formación de lípidos), expresado mediante el término " $\gamma^{O_2/Lípidos}$ " en la ecuación (1).

Así, la aportación de oxígeno servirá en segundo lugar la producción de lípidos de base.

- 5 Formación de la biomasa excluyendo el ácido graso. Término (3) de la ecuación

La biomasa total comprende las reservas lipídicas.

Estas últimas (constituidas por los ácidos grasos) se determinan por evaluación y se sustraen de la biomasa total.

La formación de la biomasa excluyendo los ácidos grasos (excluyendo los "A.G.") corresponde al crecimiento de la biomasa rica en proteínas, y por lo tanto realmente activa.

- 10 La velocidad de crecimiento se simboliza por " μ " en la ecuación (1) que representa la biomasa (excluyendo los A.G.) en g formada por g de biomasa (excluyendo los A.G.) y por hora, es decir (h^{-1}).

Para obtener la necesidad en oxígeno asociado, se multiplica esta velocidad de crecimiento (μ) por la necesidad en oxígeno para formar la biomasa excluyendo los A.G., expresado por el término: " $\gamma^{O_2/x}$ " en la ecuación (1).

Así, la aportación de oxígeno servirá en tercer lugar la producción de biomasa excluyendo los ácidos grasos.

- 15 Cálculo de la concentración de biomasa excluyendo los ácidos grasos

El crecimiento es continuo ya que, conforme al procedimiento de la invención, no existe ninguna limitación nutricional. Sin embargo, se observa una disminución de la velocidad de crecimiento independiente del agotamiento del medio.

La concentración de biomasa excluyendo los A.G. varía según la concentración de biomasa inicial y aumenta según su porcentaje de crecimiento.

- 20 Para predecir mediante el cálculo la concentración de biomasa en cada momento y estimar el valor del porcentaje de crecimiento, la compañía solicitante recomienda utilizar la ecuación (3) siguiente.

Ecuación (3)

$$\mu = \mu^{\max} \left(1 - \frac{X}{X^{\max}} \right)$$

Esta ecuación ilustra la reducción observada e inexplicada del porcentaje de crecimiento.

- 25 " μ " representa el porcentaje de crecimiento (expresado en h^{-1}) y X la concentración celular excluyendo los A.G. (expresada en g/l).

Los parámetros son diferentes para las dos cepas preferidas y recogidos en la tabla I.

Tabla I

Cepa	μ max	X max (excluyendo los A.G.)
CNCM I-4469	0,08 h^{-1}	45 g/l
CNCM I-4702	0,17 h^{-1}	40 g/l

- 30 Este fenómeno reduce también el qO_2 , ya que el porcentaje de crecimiento (μ) contribuye al consumo de oxígeno (Ecuación 1).

La concentración de biomasa se calcula a partir de la cantidad de biomasa introducida y conocida (inóculo) y de su porcentaje de crecimiento que evoluciona.

- 35 La acumulación de lípidos relacionados con un desbordamiento metabólico. Término (4) de la ecuación

Se ha determinado por la compañía solicitante que este último flujo existe sólo a partir del momento en el que las necesidades anteriormente citadas se han satisfecho y que se aporta el oxígeno necesario.

Esta aportación de oxígeno, expresada en la ecuación (1) por el término “ $q_{\text{lípidos de desbordamiento}} \times \gamma_{\text{O}_2/\text{lípidos}}$ ” provoca un aumento de la velocidad de consumo de la glucosa que se transformara en un flujo de ácido graso. Esta aportación de oxígeno suplementario podrá modularse a fin de controlar la producción de los lípidos de desbordamiento.

5 Esta aceleración de la producción de ácido graso, tal como se ilustra en el ejemplo 1, provoca un desbordamiento metabólico y lleva a una acumulación de ácido palmítico para *Thraustochytrium* y de ácidos palmítico y palmitoleico para *Schizochytrium sp.* Sin estar sujeto a esta teoría, la compañía solicitante considera que este desbordamiento está relacionado con el hecho de que las enzimas en la fase final de la vía de metabolización siguen actuando al mismo ritmo mientras que las enzimas del principio de la vía aceleran su actividad.

Cálculo de la necesidad de O₂ para formar los A.G. y la biomasa excluyendo los A.G.

10 Los rendimientos de conversión sobre O₂ permiten conocer los consumos de O₂ en función de las producciones de biomasa excluyendo los A.G. o de lípidos.

Los rendimientos de conversión son unos parámetros bien conocidos por el experto en la materia que puede, por lo tanto, determinarlo mediante experimentos rutinarios.

Estos valores se indican en la tabla II y son apropiados para las dos cepas preferidas.

15 Tabla II

Necesidad en O ₂ para la producción de biomasa excluyendo los A.G.	(g/g)	0,80	$Y_{\text{O}_2/x}$
Necesidad en O ₂ para la producción de lípidos	(g/g)	0,17	$Y_{\text{O}_2/\text{lípidos}}$

Obtención de una biomasa rica en DHA – cálculo del q_{O_2} diana

20 Para aumentar el contenido de DHA, la compañía solicitante ha establecido que era apropiado controlar la aportación de oxígeno para satisfacer sólo los 3 primeros usos del oxígeno (mantenimiento, producción de lípido de base y crecimiento de la biomasa excluyendo los A.G.). Esta aportación se puede definir mediante la determinación de q_{O_2} , que corresponde a la cantidad de O₂ necesaria en gramo por gramo de célula y por hora.

El q_{O_2} diana se define entonces por la ecuación (2), que comprende sólo los tres primeros componentes de la ecuación (1)

25 Ecuación 2:

$$q_{\text{O}_2\text{diana}} = \left(q_m \times \frac{6 \times 32}{180} \right) + \left(q_{\text{lípidos de base}} \times Y_{\text{O}_2/\text{lípidos}} \right) + \left(\mu \times Y_{\text{O}_2/x} \right)$$

(1) (2) (3)

30 Después, esta velocidad de consumo de O₂ celular se traslada al fermentador multiplicándola por la concentración de biomasa excluyendo los A.G., que puede o bien medirse o bien predecirse mediante cálculo para cada momento. Esta velocidad corresponde a OUR.

Dado que se coloca en unas condiciones en las que OTR corresponde a OUR, será por lo tanto este OTR que se aplicará para cada momento durante el procedimiento de fermentación.

35 La compañía solicitante ha encontrado que es a través del respeto de este control de la oxigenación diana por el que se obtiene una biomasa rica en DHA. Una oxigenación superior a la pretendida lleva a producir más ácido palmítico y/o ácido palmitoleico y así diluir el DHA. Una oxigenación inferior al nivel de oxigenación pretendida limita la cantidad de biomasa producida.

40 Al variar el q_{O_2} diana con la evolución del cultivo, se hace referencia en los ejemplos siguientes al OUR máximo constatado. Los ejemplos 1 y 2 ilustran el efecto del control de la oxigenación sobre las cepas CNCM I-4469 *Schizochytrium sp* y CNCM I-4702 *Schizochytrium mangrovei* y el método para obtener las velocidades de producción específicas. El ejemplo 3 ilustra, para la cepa CNCM I-4702 *Schizochytrium mangrovei* el efecto de una conducta en la cual la variación de la oxigenación permite modificar las proporciones de ácido palmítico y de DHA de la biomasa.

45 En un modo de realización alternativo, la aportación de oxígeno necesario para satisfacer las tres primeras necesidades, a saber las necesidades (1), (2) y (3) puede también determinarse de manera empírica. Como se ilustra en el ejemplo 3, el experto en la materia puede realizar diferentes procedimientos de fermentación en los que se aplica una gama de OTR y se miden las cantidades de lípidos y de biomasa. En base a estos resultados, el experto en la materia puede definir el OTR diana que permite satisfacer las tres primeras necesidades.

El procedimiento de fermentación según la presente invención permite obtener una biomasa rica en ácidos grasos. Especialmente, la biomasa comprende como mínimo un 25% de ácidos grasos en seco/peso de biomasa, preferentemente como mínimo un 30%. El porcentaje de ácidos grasos puede depender de la cepa aplicada y puede alcanzar un mínimo de un 40% en peso seco de biomasa, para la cepa I-4702.

- 5 Por otro lado, y de manera muy interesante, esta biomasa rica en lípidos presenta un porcentaje elevado de DHA. Especialmente, el procedimiento de fermentación según la presente invención permite obtener una biomasa que comprende como mínimo un 40% en peso de DHA con respecto a los ácidos grasos totales.

- 10 Finalmente, el procedimiento de fermentación según la presente invención permite obtener una biomasa que presenta un contenido reducido en ácido palmítico. Así, la biomasa comprende como máximo un 40% en peso de DHA con respecto a los ácidos grasos totales. El porcentaje de ácido palmítico puede depender de la cepa aplicada y puede alcanzar un máximo de un 10% en peso con respecto a los ácidos grasos totales para la cepa I-4469.

Por otro lado, la presente invención considera también unos procedimientos de fermentación en los que la aportación de oxígeno es superior a la necesaria para satisfacer las tres primeras necesidades, a saber las necesidades (1), (2) y (3).

- 15 Especialmente, esta aportación se controlará con el fin de obtener las proporciones relativas en DHA y ácidos palmítico y/o palmitoleico deseadas, optimizando al mismo tiempo la cantidad de biomasa producida.

- 20 Por otro lado, los procedimientos de fermentación según la presente invención se realizan en condiciones de cultivo heterotróficas. Estas condiciones adaptadas a las microalgas consideradas así como los medios de cultivo son bien conocidos por el experto en la materia. La fuente carbonada necesaria para el crecimiento de la microalga es preferiblemente la glucosa. La fuente de nitrógeno puede ser unos extractos de levadura, urea, glutamato de sodio, sulfato de amonio, amoniaco en regulación de pH, solos o en combinación. Generalmente, la etapa de cultivo comprende una etapa de precultivo, para revivificar la cepa, después una etapa de cultivo o de fermentación propiamente dicha. Esta última etapa corresponde a la etapa de producción de los lípidos de interés, en particular de DHA.

- 25 Además de la biomasa, la presente invención se refiere también a un extracto o lisado celular preparado a partir de esta biomasa. En particular, este extracto o lisado se prepara a partir de la biomasa recuperada después de la fermentación. Este extracto o lisado es rico en DHA, y opcionalmente en ácidos palmítico y/o palmitoleico. La ruptura de las células para la extracción del contenido lipídico se puede efectuar mediante diferentes vías, entre ellas las vías mecánica, química, enzimática.

- 30 A continuación, se puede extraer un aceite del lisado celular, por ejemplo con la ayuda de hexano/etanol en varias extracciones sucesivas. La fracción hexánica se separa después y se evapora después el hexano para aislar el aceite bruto.

- 35 Así, el método de producción de lípidos de interés, preferentemente DHA, y opcionalmente de ácidos palmítico y/o palmitoleico, comprende el procedimiento de fermentación según la presente invención, la recogida de la biomasa, la preparación de un extracto o lisado celular y extracción de un aceite bruto que comprende los lípidos de interés, preferentemente DHA, y opcionalmente ácidos palmíticos y/o palmitoleico.

Ejemplos

Ejemplo 1: Condiciones de cultivos de las cepas CNCM I-4469 y CNCM I-4702 y determinación de las velocidades específicas de producción en exceso de oxigenación

- 40 Condiciones de cultivos

El protocolo comprende un precultivo en matraz Erlenmeyer para una inoculación del fermentador a 0,1 g de biomasa/l para la cepa CNCM I-4469 y como mínimo 5 g de biomasa/l para la cepa CNCM I-4702.

Precultivo

El precultivo (100 ml de medio) en matraz Erlenmeyer de 500 ml con deflectores tarda 24h a una temperatura de 28°C.

- 45 El conjunto de los componentes del medio se esteriliza por filtración y se introduce en un Erlen previamente esterilizado en autoclave después de la adición de una gota de anti-espuma Clearol FBA 3107.

Tabla III

Medio de precultivo % (g/g)	
Glucosa anhidra	3
Extracto de levadura	0,4
Glutamato de sodio monosódico	6,42
NaCl	1,25
MgSO ₄ 7(H ₂ O)	0,4
KCl	0,05
CaCl ₂ (H ₂ O)	0,01
NaHCO ₃	0,05
KH ₂ PO ₄	0,4
Vitaminas solución madre B1, B6, B12	0,1
Oligoelementos solución madre	0,8

Cultivo

El medio se esteriliza en 3 partes.

La glucosa se esteriliza con KH₂PO₄ en matraz Erlenmeyer para una adición justo antes de T₀.

- 5 El resto de las sales se esteriliza en fermentador con 0,05 ml/l de Clearol FBA 3107. Los oligoelementos y vitaminas se esterilizan por filtración.

El volumen de T₀ representa el 75% del volumen final. El pH se ajusta a T₀ por amoníaco y después se regula a 6 siempre con amoníaco.

Tabla IV

10

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

Se aporta en continuo un Fed batch de glucosa (concentración: 500 g/l de Fed) a partir de T₀ a un ritmo constante (a adaptar según cálculos) para no estar a una concentración inferior a 20 g/l y 5 g/l al final.

El cultivo se lleva a cabo a la temperatura de 28°C y tarda de 65 a 85 horas.

- 15 La utilización de licor de agua de remojo de maíz (acrónimo "CSL") o de extractos de levaduras (acrónimo "EL") como fuente de nitrógeno es posible, lo que permite obtener unos resultados ligeramente superiores en DHA.

Soluciones madres

Tabla V

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

Tabla VI

Vitaminas	g/l
B1	45
B6	45
B12	0,25

5

Determinación de las velocidades de producción específicas

Para evaluar las velocidades de producción específicas, se ha realizado un primer cultivo a pO₂ 10%, lo que significa que se asegura que quede siempre oxígeno disuelto en el medio. Este cultivo se ha llevado a cabo sin limitación en fuentes nutritivas.

10 Este método permite poner en evidencia las características de las cepas a ensayar, en excesos de oxígeno (figura 1).

En la tabla VII, los resultados presentados son los obtenidos a T65 del cultivo de las biomásas de las dos cepas CNCM I-4469 y CNCM I-4702.

Tabla VII: Biomásas y composiciones en ácidos grasos

	CNCM I-4469	CNCM I-4702
Biomasa (g/l)	51,2	79
Contenido de A-G / Biomasa total (g/g)	0,38	0,57
DHA / A.G. (g/g)	0,34	0,19
Ácido palmítico / A.G (g/g)	0,28	0,67
Otros ácidos grasos /A.G. (g/g)	0,38	0,14
A.G. significa Ácido Graso		

15

Los diferentes ácidos grasos diferentes de los DHA y ácidos palmíticos (especialmente ácido palmítico) se agrupan bajo la denominación de "otros ácidos grasos" para poner en evidencia el efecto sobre el DHA y el ácido palmítico, pero reúnen los lípidos de base con el DHA en el cálculo del qO_2 diana.

El cálculo de las velocidades medias se realiza globalmente.

- 5 La biomasa final se analiza por cromatografía en fase gas (CPG). Se conoce entonces la concentración de biomasa total, el contenido de cada uno de los ácidos grasos y el contenido global de los ácidos grasos.

La biomasa excluyendo los ácidos grasos, denominada también biomasa activa, se calcula por sustracción de estos ácidos grasos a la biomasa total.

- 10 La cantidad de cada uno de los ácidos grasos producidos se divide después por la media de la biomasa excluyendo los A.G. presente y por el tiempo. El resultado obtenido es una velocidad específica global de producción por unidad de tiempo y por g de biomasa excluyendo los A.G.

Estas velocidades se presentan en la tabla VII siguiente.

Tabla VIII: cálculo de las velocidades

		CNCM I-4469	CNCM I-4702
μ biomasa activa	(h^{-1})	0,05	0,055
q lípidos	(g/g/h)	0,034	0,074
q(DHA)	(g/g/h)	0,011	0,014
q(palm)	(g/g/h)	0,009	0,050
q(otros A.G.)	(g/g /h)	0,013	0,010

15

Ejemplo 2: Cultivos de las cepas CNCM I-4469 y CNCM I-4702 con una aportación de oxígeno controlado

Se utilizaron las mismas condiciones de cultivos, pero se controló la aportación de oxígeno.

El método consiste en utilizar la mitad del valor de la transferencia observada (OUR) durante el cultivo al 10% (aquí; 50 mmoles/Uh véase el gráfico 1, es decir 25 mmoles/Uh)(Figura 2).

- 20 Por otro lado, para un fermentador de 20 l, para respetar el buen funcionamiento de éste, sean cuales sean las necesidades en oxigenación, se fija a t_0 una agitación mínima, del orden de 150 rpm, durante las 10 a 15 primeras horas de cultivo.

En la tabla IX, los resultados presentados son los obtenidos a T65 del cultivo de las biomazas de las dos cepas CNCM I-4469 y CNCM I-4702 en condiciones de aportación de O_2 controlada.

25

Tabla IX: Biomazas y composiciones en ácidos grasos

	CNCM I-4469	CNCM I-4702
Biomasa (g/l)	34	59
Contenido de A-G / Biomasa total (g/g)	0,29	0,45
DHA / A.G. (g/g)	0,52	0,44
Ácido palmítico / A.G. (g/g)	0,04	0,39
Otros ácidos grasos /A.G. (g/g)	0,44	0,17

El cálculo de las velocidades se realiza globalmente como se indica en el ejemplo 1. Los resultados se dan en la tabla X.

Tabla X: Cálculo de las velocidades

		CNCM I-4469	CNCM I-4702
μ biomasa activa	(h ⁻¹)	0,05	0,055
q lípidos	(g/g/h)	0,021	0,045
q(DHA)	(g/g/h)	0,011	0,02
q(palm)	(g/g/h)	0,001	0,018
q(otros A.G.)	(g/g/h)	0,009	0,007

5 Comparando las velocidades específicas globales de producción en condiciones de excesos en oxígeno (valores de la tabla VIII) y en condiciones controladas en oxígeno, se constata que:

- la aportación de oxígeno ha permitido disminuir la velocidad de producción de ácido palmítico,

- la velocidad de producción de ácido palmítico se disminuye de un factor 9 para la cepa CNCM I-4469 y por 3 para la cepa CNCM I-4702.

Este resultado se obtiene mientras que las velocidades de producción de biomasa o de DHA siguen sin cambiar.

10 Así, se previene la producción de lípidos en el contexto de un desbordamiento metabólico.

Las velocidades evaluadas por este método sirven de base al cálculo de qO_2 diana.

Cálculo de qO_2 con las ecuaciones 1 y 2

15 Las velocidades de producción de los lípidos de la tabla X representan aquí el flujo constante de los lípidos de base ($Q_{lipidosdebase}$ en las ecuaciones 1 y 2), cuyo DHA es el constituyente principal pero que comprende también un poco de ácido palmítico.

El flujo de desbordamiento metabólico corresponde al flujo suplementario, entre las velocidades de la tabla VIII y la de la tabla X.

El q_m es despreciable en las condiciones de cultivo no estresantes; se mantiene un valor de 0,006 g/g/h.

20 El porcentaje de crecimiento se reduce con el aumento de la concentración de biomasa; el porcentaje de crecimiento máximo puede mantenerse hasta 4 g/l de biomasa excluyendo los lípidos para CNCM I-4702 y 7 g/l para CNCM I-4469 inoculado a 5 g/l.

Se puede trasladar el qO_2 (consumo a nivel celular) al OTR (aportación que corresponde al nivel del fermentador) teniendo en cuenta la concentración de biomasa.

Para la cepa CNCM I-4469 colocándose a $\mu^{m\acute{a}x}$

25 EC 2:

$$qO_{2Diana} = 0,006 * 1,07 + (0,011 + 0,001 + 0,009) * 0,17 + 0,08 * 0,8 = 0,106 \text{ g/g/h}$$

lo que corresponde a:

$$OTR_{Diana} = 0,106 * 7 = 0,74 \text{ g de } O_2 \text{ por L de cultivo y por hora}$$

o

30 $OTR_{Diana} = 0,106 * 7 * 1000 / 32 = 23 \text{ mmoles de } O_2 / \text{l de cultivo y por /h}$

Para la cepa CNCM I-4702, colocándose a $\mu^{m\acute{a}x}$

EC 2:

$$qO_{2Diana} = 0,006 * 1,07 + (0,02 + 0,018 + 0,07) * 0,17 + 0,17 * 0,8 = 0,218 \text{ g/g/h}$$

lo que corresponde a:

$OTR_{Diana} = 0,218 \cdot 4 = 0,87$ (g de O_2 por L de cultivo y por hora)

$OTR_{Diana} = 0,218 \cdot 4 \cdot 1000 / 32 = 27,4$ mmoles de O_2/l de cultivo y por /h

La utilización de estas ecuaciones completadas por los datos de la tabla X permite simular el cultivo, y determinar el OTR_{Diana} a aplicar.

- 5 Este último se reduce con la bajada del porcentaje de crecimiento, pero esto se compensa parcialmente por el aumento de la concentración de biomasa.

El OTR_{Diana} sigue siendo por lo tanto similar al expresado anteriormente, hasta alcanzar un porcentaje nulo de crecimiento de la biomasa excluyendo los lípidos.

Ejemplo 3: Comportamiento de la fermentación con diferentes condiciones de OTR

- 10 Los ensayos realizados en los ejemplos 1 y 2, sin limitación en fuentes nutritivas, permiten establecer un modelo por el cual es posible controlar la producción de lípidos respetando un qO_2 diana definido por la ecuación 2 (que vale 27,4 mmoles de O_2/l de cultivo y por /h – véase el ejemplo 2).

A partir de este qO_2 inicial, se han ensayado unas variaciones.

Los niveles de variación, a ambos lados de este qO_2 diana, se ilustran aquí por el OTR máx al principio de cultivo.

- 15 El valor de OTR máx comprendido entre 25 y 30 corresponde al OUR óptimo al principio del cultivo definido en el ámbito de la invención para controlar la aportación de oxígeno y a fin de respetar el qO_2 diana.

La tabla XI presenta los parámetros de fermentación medidos a T65 con CNCM I-4702.

Tabla XI

% du qO_2 diana	OTR Máx (mmol/l/h) al principio del cultivo	Concentraciones			
		Biomasa (g/l)	Ácidos grasos (g/100g) de biomasa	Ácido palmítico (g/100 g de lípidos)	DHA (g/100 g de lípidos)
60	15	41	41	36	48
75	20	52	41	36	46
100	25	57	47	39	45
	30	60	48	43	43
150	40	74	55	49	37
200	50	81	61	57	30

- 20 Así, en base a estos resultados, se puede constatar que, cuando el oxígeno es aportado en exceso con respecto al valor definido por la ecuación 2, se observa una dilución del DHA en los lípidos de desbordamiento, especialmente el ácido palmítico.

- 25 Al contrario, cuando la aportación de oxígeno es insatisfactoria con respecto al valor definido por la ecuación 2, la cantidad de DHA producida es menor.

Ejemplo 4: ejemplo comparativo con y sin limitación deficiente en nitrógeno.

Los ensayos se han realizado con:

- 30 - en control: la cepa CNCM I-4702, cultivada en las condiciones definidas en el estado de la técnica constituido por la solicitud de patente WO 01/54510, es decir disociación de la fase de crecimiento y de producción, ella misma inducida durante la etapa de limitación de la aportación de fuente nitrogenada. Esta limitación se ha inducido aquí por la interrupción de la regulación de pH con el amoniaco, al final de la primera tercera parte del cultivo.

A fin de dar cuenta sólo del comportamiento de la cepa CNCM I-4702 en cuanto a su producción de lípidos en condiciones de deficiencia en nitrógeno, la aireación no se ha regulado en cascada, sino que se ha mantenido a una pO_2 superior al 10%.

- 5 - una fermentación en la que, durante toda la duración del cultivo, no se ha impuesto ninguna limitación nutricional a la cepa, y la pO_2 se ha regulado también al 10%.

Los resultados son los siguientes:

Tabla XII

		Ninguna limitación nutritiva	Limitación en nitrógeno
Biomasa	(g/l)	76	86
Ácidos grasos sobre biomasa	(g/g)	0,57	0,65
Palmítico / AG	(g/g)	0,67	0,62
DHA / AG	(g/g)	0,21	0,24

- 10 La riqueza en ácido graso de la biomasa se reduce sólo un poco sin limitación nutritiva. Contrariamente a los prejuicios técnicos en la materia, no es, por lo tanto, necesaria una limitación de fuente nitrogenada para inducir la producción de lípidos.

Ejemplo 5: ejemplo comparativo con la cepa ATCC 20888.

- 15 El protocolo de cultivo utilizado es el descrito en el ejemplo 4 de la solicitud de patente WO 01/54510. La cepa utilizada es *Schizochytrium sp* ATCC 20888.

A continuación, se da la enseñanza de dicha solicitud, en comparación con los dos modos de comportamiento siguientes:

1. Una regulación permanente superior al 10%
2. Una pO_2 del 0% constante

- 20 Los resultados obtenidos se presentan en la tabla XIII siguiente.

Tabla XIII

	pO_2 0% constante	pO_2 según el protocolo de WO 01/54510 (8 - 4 - 0,5 a 0%)	pO_2 10 % constante
Tiempo (h)	74	74	74
AGPI/total de ácidos grasos (%)	44,0	43,8	36,1
DHA/total de ácidos grasos (%)	33,6	32,8	27,1
total de ácidos grasos (%) Biomasa	45,9	44,6	44,8
Biomasa total (g/l)	166	147	187
DHA g/l/h	0,35	0,29	0,31
DHA % Biomasa	15	15	12
Inóculo (indicativo) g/l	23	10,5	11

5 Siguiendo las enseñanzas del estado de la técnica, especialmente las de la solicitud de patente WO 01/54510, se encuentra así que, contrariamente a lo que se divulga, una regulación constante de la pO_2 al 0% o a más del 10% durante todo el tiempo de la fermentación, permitía producir más del 35% de AGPI en los ácidos grasos, así como con un comportamiento razonado con una reducción de la pO_2 en cascada (un 10%, después un 4%, después un 0,5% de saturación).

Listado de secuencias

<110> ROQUETTE FRERES

<120> PROCEDIMIENTO DE ENRIQUECIMIENTO EN DHA DE LA BIOMASA DE MICROALGAS DEL GÉNERO TRAUSTOCHYTRIUM

5 <130> B1734PC

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 479

10 <212> ADN

<213> *Schizochytrium sp*

<400> 1

```

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

```

<210> 2

15 <211> 454

<212> ADN

<213> *Schizochytrium mangrovei*

<400> 2

```

ggttttacat tgctctcatt ccgatagcaa aacgcataca cgcttcgcat cgatatttct    60
cgtcctacct cgtggagtcc acagtgggta atttacgctc ctgctgctat ccttggatat    120
ggtagccgctc tctcaggctc cctctccgga gtcgagccct aactctccgt caccggttat    180
agtcaccgta gtccaataca ctaccgtcga caactgatgg ggcagaaact caaacgattc    240
atcgaccaa awagtcaatc tgctcaatta tcatgattca ccaataaaat cggcttcaat    300
ctaataagtg cagccccata cagggctctt acagcatgta ttatttccag aattactgca    360
ggtatccata taaagaaac taccgaagaa attattactg atataatgag ccgttcgag    420
tctcacagta caatcgctta tacttacaca gcag                                454

```

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de producción de una biomasa de microalgas del género *Thraustochytrium* enriquecida en ácido docosahexaenoico (DHA), caracterizado por que, durante la fase de cultivo en condiciones heterotróficas, la aportación de oxígeno se controla con el fin de satisfacer únicamente las necesidades en oxígeno 1) para la producción de energía necesaria para el mantenimiento celular, 2) para la producción de lípidos de base, y 3) para el crecimiento de la biomasa excluyendo los ácidos grasos y por que la aportación de oxígeno necesaria para satisfacer únicamente las necesidades 1), 2) y 3) se calcula mediante la ecuación 2 siguiente

$$qO_2Diana = (qm \times \frac{6 \times 32}{180}) + (qlípidosbase \times y^{O_2/lípidos}) + (\mu \times Y^{O_2/x})$$

en la que

10 qO_2Diana es la cantidad de oxígeno en gramo por gramo de biomasa excluyendo los ácidos grasos y por hora;
 qm es el coeficiente de mantenimiento expresado en g de glucosa por g de biomasa excluyendo los ácidos grasos y por hora;

$qlípidosbase$ es la velocidad de acumulación de los lípidos de base expresada en g de lípidos de base por g de biomasa excluyendo los ácidos grasos y por hora;

15 $y^{O_2/lípidos}$ es el coeficiente de consumo de oxígeno con relación a la formación de lípidos expresado en g de oxígeno por g de lípidos,

μ es la velocidad de crecimiento expresada en g de biomasa excluyendo los ácidos grasos formada por g de biomasa excluyendo los ácidos grasos y por hora, es decir (h^{-1});

20 $Y^{O_2/x}$ es el coeficiente de consumo de oxígeno con respecto a la formación de biomasa excluyendo los ácidos grasos expresado en g de oxígeno por g de biomasa excluyendo los ácidos grasos.

2. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que ninguna limitación de un elemento nutritivo, especialmente en fuente carbonada o nitrogenada, se aplica durante el procedimiento de fermentación.

25 3. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que las fases de crecimiento y de producción de DHA son concomitantes.

4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que las microalgas son del género *Schizochytrium sp* o *Schizochytrium mangrovei*.

30 5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que las microalgas son una cepa seleccionada entre las cepas CNCM I-4469 y CNCM I-4702 depositadas a la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos del Instituto Pasteur respectivamente el 14 de abril de 2011 y el 22 de noviembre de 2012.

6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que comprende además la recogida de la biomasa, eventualmente la preparación de un extracto o lisado celular a partir de esta biomasa, después facultativamente la extracción de un aceite bruto rico en DHA.

35 7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la biomasa obtenida comprende como mínimo un 40% de DHA en peso de ácidos grasos totales.

8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la biomasa obtenida comprende como máximo un 40% de ácido palmítico en peso de ácidos grasos totales.

9. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la biomasa obtenida comprende como mínimo un 25% de ácidos grasos en seco/peso de biomasa.

40

FIGURA 1

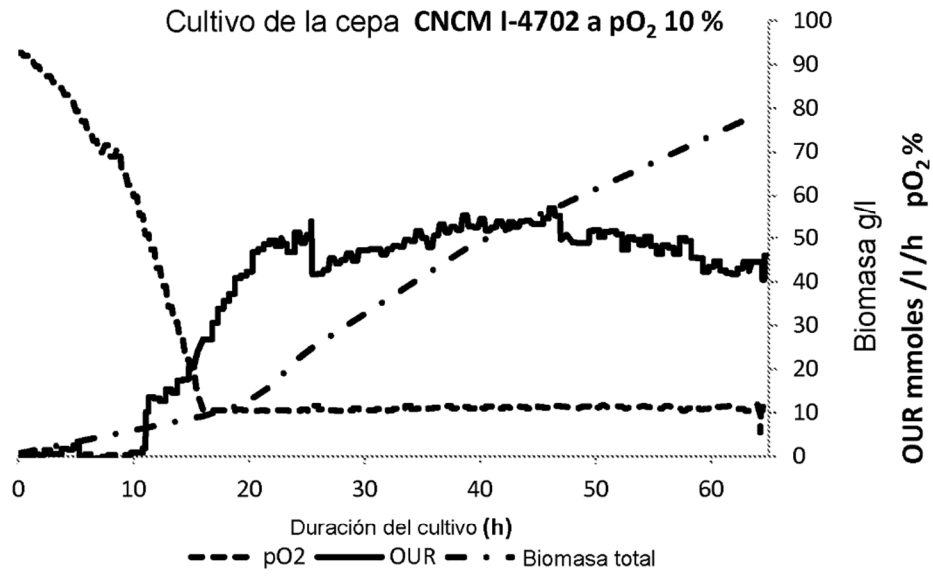


FIGURA 2

