

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 762 618**

51 Int. Cl.:

C12N 1/12 (2006.01)
C12P 7/40 (2006.01)
C12P 7/62 (2006.01)
C12P 7/64 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12R 1/89 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.01.2014** **PCT/JP2014/050753**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.07.2014** **WO14112574**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.01.2014** **E 14741072 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019** **EP 2947141**

54 Título: **Microorganismos que producen ácido docosahexaenoico y utilización de los mismos**

30 Prioridad:

18.01.2013 JP 2013007006

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.05.2020

73 Titular/es:

KYOWA HAKKO BIO CO., LTD. (100.0%)
6-1, Ohtemachi 1-chome Chiyoda-ku
Tokyo 100-8185, JP

72 Inventor/es:

UJIHARA, TETSURO;
NAGANO, MEGUMI y
TABATA, KAZUHIKO

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 762 618 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

Microorganismos que producen ácido docosahexaenoico y utilización de los mismos.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un nuevo microorganismo que produce ácido docosahexaenoico (en adelante en la presente memoria denominado "DHA") y a métodos para producir una composición que contiene DHA, DHA y alquil-éster de DHA utilizando el microorganismo.

10 **Antecedentes de la técnica**

El DHA es un ácido graso poliinsaturado contenido abundantemente en los fosfolípidos cerebrales y similares de los mamíferos, incluyendo el ser humano, y es conocido que desempeña un papel importante en el mantenimiento o desarrollo de las funciones cerebrales. El ser humano posee la capacidad de sintetizar DHA a partir de ácido linolénico; sin embargo, la cantidad del mismo es mucho menor de la necesaria y es conocido que el DHA debe obtenerse del exterior. Por este motivo, se comercializan muchos alimentos, complementos y leche para bebés que contienen DHA.

Entre los ejemplos de DHA contenido en dichos productos se incluye el DHA obtenido mediante extracción a partir de aceites de pescado. Los aceites de pescado son económicos y ricos en DHA y, por lo tanto, son buenas fuentes de DHA. Sin embargo, considerando el reciente incremento de la demanda de DHA, la acumulación de PCB o metales pesados en peces que acompaña a la contaminación marina, etc., se demanda un suministro más seguro y estable de DHA.

Además del DHA obtenido mediante extracción a partir de aceites de pescado, entre los ejemplos se incluye DHA producido mediante un método de fermentación utilizando un microorganismo. Se ha conocido desde hace mucho tiempo que las microalgas marinas producen un lípido que contiene DHA (documento no de patente nº 1). Sin embargo, existen problemas en que la cantidad de DHA contenida en las microalgas es reducida, el cultivo a alta densidad resulta difícil, etc. y, por lo tanto, no se ha llevado a cabo la producción a un nivel comercial.

Como método para producir DHA mediante fermentación a un nivel comercial, la utilización del dinoflagelado *Cryptothecodinium cohnii* es el primer estudio (documento de patente nº 1 y documentos no de patente nº 2 y nº 3). Posteriormente se han encontrado múltiples microorganismos que poseen la capacidad de producir DHA, y son microorganismos que muestran la máxima capacidad de producir DHA, microorganismos *Labyrinthulea* y entre los ejemplos de dichos microorganismos se incluyen *Schizochytrium* sp. cepa ATCC 20888 y cepas derivadas de la misma (documentos de patente nº 2 y nº 3), *Aurantiochytrium limacinum* (anteriormente clasificado como *Schizochytrium limacinum*) cepa SR21 (documentos de patente nº 4 a nº 6 y el documento no de patente nº 4), el microorganismo *Labyrinthulea* cepa 12B (documento de patente nº 7), *Thraustochytrium* sp. cepa LEF (documento de patente nº 8) y similares. El documento WO 2007/068997 A2, Yang H.L. et al. ("Isolation and Characterization of Taiwanese Heterotrophic Microalgae: Screening of Strains for Docosahexaenoic Acid (DHA)", Marine Biotechnology, vol. 12, páginas 173-185); documento WO 2011/139040 A2; Won-Kyung Hong et al. ("Production of Lipids Containing High Levels of Docosahexaenoic Acid by a Newly Isolated Microalga, sp. KRS101" Applied Biochemistry and Biotechnology; parte A; Enzyme Engineering and Biotechnology, Humana Press Inc, vol. 164, nº 8, páginas 1468-1480) dan a conocer cepas de traustoquítridos que presentan secuencias de ARNr 18S diferentes de SEC ID nº 1 a nº 5.

El documento JP 2004 501603 A da a conocer cepas de *Thraustochytrium* y *Schizochytrium* que son capaces de producir DHA.

El documento WO 2012/175027 A1 se refiere a métodos de mutagénesis de *Schizochytrium* sp y cepas variantes producidas a partir del mismo.

El documento JP H10 72590 A da a conocer *Aurantiochytrium limacinum* cepa SR21, que produce ácido docosahexaenoico (DHA).

Entre estos microorganismos *Labyrinthulea*, un microorganismo que muestra la máxima capacidad de producción de DHA es *Schizochytrium* cepa S31 (cepa ATCC nº 20888) (documento de patente nº 9). La capacidad de producir DHA del microorganismo es mucho más elevada que en otros informes, y el método de fermentación para DHA que utiliza el microorganismo puede afirmarse que es el procedimiento de producción mediante fermentación de menor coste.

Sin embargo, ni siquiera con el procedimiento de producción mediante fermentación, el coste es superior al del método de extracción a partir de aceites de pescado y, por lo tanto, se han requerido mejoras adicionales de la productividad.

Documentos de la técnica relacionada

Documentos de patente

- 5 Documento de patente nº 1: JP-T-5-503425
 Documento de patente nº 2: JP-T-8-502405
 Documento de patente nº 3: JP-T-8-509355
 Documento de patente nº 4: JP-A-9-000284
 Documento de patente nº 5: JP-A-10-072590
 10 Documento de patente nº 6: JP-A-10-310556
 Documento de patente nº 7: JP-A-2006-230403
 Documento de patente nº 8: JP-A-2005-102680
 Documento de patente nº 9: JP-T-2004-501603

15 Documentos no de patente

- Documento no de patente nº 1: J. Protozoal (1970), Vol. 17, pp. 213-219
 Documento no de patente nº 2: Single Cell Oils AOCS Press (2005), vol. 6, páginas 86-98
 Documento no de patente nº 3: Single Cell Oils AOCS Press (2005), vol. 8, páginas 107-123
 20 Documento no de patente nº 4: APL. Microbiol. Biotechnol. (1998), vol. 49, páginas 72-76

Sumario de la invención

Problemas que debe resolver la invención

- 25 Un objetivo de la presente invención es proporcionar un microorganismo que presente una capacidad más elevada de producir DHA que anteriormente y asimismo proporcionar métodos eficientes para producir una composición que contiene DHA, y alquil-éster de DHA utilizando el microorganismo.

30 Medios para resolver los problemas

La presente invención se refiere a formas de realización según definen en las reivindicaciones y en [1] a [5], a continuación.

- 35 [1] Un microorganismo perteneciente al género *Aurantiochytrium* que presenta un gen de ARNr 18S consistente en la secuencia de bases representada mediante cualquiera de las SEC ID nº 1 a nº 5.
 [2] *Aurantiochytrium* sp. cepa OH4 (número de acceso: FERM BP-11524).
 40 [3] Un método para producir una composición que contiene DHA, que comprende cultivar el microorganismo indicado en cualquiera de [1] a [2], anteriormente, en un medio que permite producir la composición que contiene DHA y acumularla en un cultivo, y recolectar la composición que contiene DHA a partir del cultivo.
 45 [4] Un método para producir DHA, que comprende separar y recolectar DHA a partir de la composición que contiene DHA recolectada en [3], anteriormente.
 [5] Un método para producir alquil-éster de DHA, que comprende separar y recolectar alquil-éster de DHA a partir de la composición que contiene DHA recolectada en [3], anteriormente.

50 La exposición se refiere a:

- [3] Un microorganismo que es un mutante obtenido a partir del microorganismo indicado en [1] o [2], anteriormente, como cepa parental y que presenta una capacidad más elevada de producir DHA que la cepa parental.
 55 [4] *Aurantiochytrium* sp. cepa LTR23.

Efectos de la invención

- 60 Según la presente invención, se proporciona un microorganismo perteneciente al género *Aurantiochytrium* que presenta un gen de ARNr 18S consistente en la secuencia de bases representada mediante cualquiera de las SEC ID nº 1 a nº 5, y un método para producir la composición que contiene DHA, DHA y alquil-éster de DHA, mediante un procedimiento de fermentación utilizando el microorganismo.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una vista que representa las cantidades producidas de DHA y las proporciones de DHA a ácidos grasos totales en microorganismos productores de DHA recogidos de una zona costera de Okinawa.

La figura 2 es una fotomicrografía de *Aurantiochytrium* sp. cepa OH4.

La figura 3 es una vista en que se añade a la figura 1 la cantidad producida de DHA y las proporciones de DHA a ácidos grasos totales en *Aurantiochytrium* sp. cepa LTR23.

Formas de realización para poner en práctica la invención1. Microorganismo de la invención

El microorganismo de la presente invención es un microorganismo perteneciente al género *Aurantiochytrium* que presenta uno o más, preferentemente dos o más, más preferentemente tres o más, todavía más preferentemente cuatro o más genes de ARNr 18S, consistiendo cada uno en la secuencia de bases representada mediante cualquiera de las SEC ID nº 1 a nº 5, y es más preferentemente un microorganismo perteneciente al género *Aurantiochytrium* que presenta la totalidad de los genes de ARNr 18S consistente en la secuencia de bases representada mediante las SEC ID nº 1 a nº 5, respectivamente. Basándose en las características morfológicas y las características biológicas moleculares, tal como se mencionan posteriormente, el microorganismo de la presente invención se considera que pertenece al filo Heterokonta del reino *Chromista* y pertenece además al orden *Labyrinthulida* de la clase *Labyrinthulea*. Con respecto a los rangos taxonómicos de familia y posteriormente, considerando las características fisiomorfológicas y las secuencias de bases de los genes de ARNr 18S, se considera que pertenece al género *Aurantiochytrium* de la familia *Thraustochytriaceae*.

Entre los ejemplos del microorganismo de la presente invención se incluyen *Aurantiochytrium* sp. cepa OH4 (número de acceso: FERM BP-11524) y similares. Además, los microorganismos que son mutantes obtenidos mediante la utilización del microorganismo de la presente invención como cepa parental y que presentan una capacidad más elevada de producir DHA que la cepa parental asimismo pueden producirse de acuerdo con la presente exposición. Entre los ejemplos de dicho microorganismo se incluyen *Aurantiochytrium* sp. cepa LTR23, y similares.

El anteriormente mencionado *Aurantiochytrium* sp. cepa OH4 se ha depositado en el depósito de microorganismos de patente del National Institute of Technology and Evaluation (NITE), situado en Central 6, 1-1, Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japón (código postal 305-8566). La fecha de recepción (fecha de depósito) es 11 de enero de 2013, y el número de acceso es FERM BP-11524.

La cepa parental tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una cepa original que debe someterse a la introducción de una mutación, sustitución génica mediante una técnica de recombinación de ADN o similar. La cepa original que debe someterse a sustitución génica mediante una técnica de recombinación de ADN o similar asimismo se denomina cepa huésped.

El mutante tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un microorganismo que puede obtenerse mediante la utilización de un método convencional de introducción de mutaciones, un método de sustitución génica mediante una técnica de recombinación de ADN, o similar, a partir del microorganismo de la presente invención como cepa parental.

El microorganismo que presente una capacidad más elevada de producir DHA que la cepa parental tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un microorganismo en el que la cantidad de composición que contiene DHA o DHA que puede obtenerse a partir del cultivo completo es elevada al cultivar la cepa parental y el mutante bajo las mismas condiciones de cultivo.

Entre los ejemplos de la composición que contiene DHA pueden incluirse aceites y grasas que contienen DHA o fosfolípidos que contienen DHA, preferentemente aceites y grasas que contienen DHA.

Hasta ahora se han encontrado muchos tipos de microorganismos pertenecientes al género *Aurantiochytrium*; sin embargo, el microorganismo de la presente invención presenta una secuencia de bases diferente del gen de ARNr 18S que dichos microorganismos y, además, tal como se muestra en los ejemplos indicados posteriormente, el peso celular seco y el contenido de DHA al cultivar el microorganismo son significativamente más elevados que en los microorganismos convencionalmente conocidos de los que se informa como microorganismos de elevada producción de DHA y, por lo tanto, el microorganismo de la presente invención puede distinguirse claramente de los microorganismos convencionalmente conocidos pertenecientes al género *Aurantiochytrium*.

2. Método para la obtención del microorganismo de la invención

El microorganismo de la presente invención puede obtenerse mediante el método siguiente.

- 5 Se recoge una muestra del océano, preferentemente de agua salobre, más preferentemente de hojas caídas recogidas del suelo de un manglar.

La muestra se sumerge en agua marina artificial que contiene un antibiótico, preferentemente penicilina G y estreptomicina, y después, el sobrenadante del agua marina artificial se aplica sobre un medio de agar que contiene el antibiótico y se incuba durante varios días a una temperatura de 20°C a 40°C, preferentemente a 25°C. De esta manera, muchos procariotas presentes en el medio ambiente no pueden crecer y, por lo tanto, el microorganismo de la presente invención, que es un eucariota, puede concentrarse.

- 15 Se aísla una colonia y a partir del cultivo obtenido mediante cultivo utilizando un medio líquido, se extrae el ADN genómico siguiendo un procedimiento común. Mediante la utilización del ADN genómico como molde, se lleva a cabo una reacción de PCR utilizando oligo-ADN con las secuencias de bases representadas mediante SEC ID nº 6 y nº 7, respectivamente, que pueden amplificar un gen de ARNr 18S, como conjunto de cebadores.

A uno de los cebadores del conjunto se le añade una etiqueta compuesta de 3 a 6 bases, preferentemente 4 a 5 bases, más preferentemente 4 bases para el análisis simultáneo de múltiples muestras de acuerdo con "High-speed sequence analysis outsourcing service, Application No. 01, Analysis of 16S rRNA PCR sample" (tríptico de Takara Bio, Inc.). Además, a ambos cebadores se añade un oligonucleótido necesario para el análisis con un secuenciador GS FLX (Roche Diagnostics K.K.).

- 25 Mediante la determinación de la secuencia con el secuenciador GS FLX utilizando el producto de reacción de PCR anteriormente mencionado, por ejemplo, en el caso de que se fije el tamaño de la etiqueta anteriormente mencionada en 4 bases, y hasta 256 tipos de secuencias de etiqueta, pueden secuenciarse 256 tipos de genes de ARNr 18S mediante una operación de secuenciación sin requerir una operación de clonación. Específicamente, mediante la mezcla de 256 tipos de productos de PCR, se determinan las secuencias de bases con el secuenciador GS FLX y las secuencias de bases tras la determinación se clasifican en 256 tipos mediante la utilización de las secuencias de la etiqueta como índice.

El ADN genómico que debe utilizarse como el molde para la reacción de PCR puede ser un ADN genómico extraído de una sola cepa o puede ser una mezcla de ADN genómicos extraídos de múltiples cepas. Sin embargo, en el caso de que se utilice una mezcla de ADN genómicos extraídos de múltiples cepas, el cribado de muchas cepas puede llevarse a cabo más convenientemente mediante la combinación del método indicado posteriormente.

- 35 Por ejemplo, se amplifica una región génica de ARNr 18S mediante la mezcla de los ADN genómicos extraídos de 100 tipos de cepas y se utiliza la mezcla resultante como un molde para una reacción de PCR y asimismo utilizando el conjunto de cebadores anteriormente indicado.

Los productos de PCR se secuencian con el secuenciador GS FLX y, en el caso de que se encuentre presente el gen de ARNr 18S que consiste en la secuencia de bases representada mediante cualquiera de las SEC ID nº 1 a nº 5, se observa que se encuentra presente por lo menos una cepa del microorganismo de la presente invención entre los 100 tipos de cepas. Por otra parte, en el caso de que no se encuentre presente el gen de ARNr 18S, se observa que el microorganismo de la presente invención no se encuentra presente entre los 100 tipos de cepas.

- 45 En el caso de que se encuentre presente el microorganismo de la presente invención entre los 100 tipos de cepas, puede especificarse el microorganismo utilizando un método con el secuenciador GS FLX anteriormente indicado mediante una operación de secuenciación.

Es decir, mediante la utilización del método anteriormente indicado, en el caso en que se fije el tamaño de la secuencia de etiqueta en 4 bases, pueden analizarse hasta 256 tipos de ADN genómicos mixtos mediante la primera operación de secuenciación, y el microorganismo de la presente invención puede determinarse de entre un máximo de 256 tipos de microorganismos mediante la segunda operación de secuenciación y, por lo tanto, con respecto a un máximo de 65,536 tipos de microorganismo, puede determinarse si un microorganismo es o no el microorganismo de la presente invención mediante únicamente dos operaciones de secuenciación sin requerir una operación de clonación.

- 60 Por otra parte, en el caso de que se fije el tamaño de la secuencia de etiqueta en 5 bases, pueden analizarse hasta 1.024 tipos de ADN genómicos mixtos mediante la primera operación de secuenciación, y el microorganismo de la presente invención puede determinarse de entre un máximo de 1.024 tipos de microorganismos mediante la segunda operación de secuenciación y, por lo tanto, con respecto a un máximo de 1,048,576 tipos de microorganismo, puede determinarse si un microorganismo es o no el microorganismo de la presente invención mediante únicamente dos operaciones de secuenciación sin requerir una operación de clonación.

El microorganismo que debe someterse al análisis de secuenciación anteriormente indicado puede confirmarse que produce DHA previamente. De esta manera, en el caso de que el número de cepas que debe analizarse sea pequeño, asimismo puede determinarse si el microorganismo es o no el microorganismo de la presente invención mediante determinación de la secuencia utilizando el método de Sanger convencional.

El mutante de la presente exposición con una mayor capacidad de producir DHA que la cepa parental puede obtenerse mediante la utilización del microorganismo de la presente invención como cepa parental y utilizando un método convencional de tratamiento de mutación, por ejemplo se lleva a cabo un tratamiento de mutación de manera que la tasa de mortalidad del microorganismo sea de 98%, preferentemente de 99%, lo más preferentemente de 99.9%, con un tratamiento con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) o un tratamiento de radiación UV y se aísla una colonia superviviente y se examina la productividad de DHA.

La productividad de DHA puede examinarse mediante un método en el que se extrae un lípido a partir de una solución de cultivo utilizando el método de Bligh y Dyer (Bligh E.G. Y Dyer W.J., Can. J. Biochem. Physiol. 37 911 (1959)) y se seca bajo presión reducida y después el lípido seco se somete a metilación de los ácidos grasos utilizando el kit de metilación de ácidos grasos (Nacalai Tesque, Inc.) y el metil-éster de ácido graso obtenido se extrae con n-hexano y se analiza mediante cromatografía de gases.

3. Método para producir la composición que contiene DHA de la invención

Puede producirse una composición que contiene DHA mediante el cultivo del microorganismo de la presente invención en un medio que permite producir y acumular en el cultivo la composición que contiene DHA y recolectar la composición que contiene DHA a partir del cultivo.

El cultivo del microorganismo de la presente invención puede obtenerse mediante inoculación del microorganismo en un medio apropiado y cultivo del microorganismo según un procedimiento común.

Respecto al medio, puede utilizarse cualquier medio conocido que contenga una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, una sal inorgánica y similares. Entre los ejemplos de la fuente de carbono se incluyen un carbohidrato, tal como glucosa, fructosa o galactosa, y aparte de ellos, un aceite o un lípido, tal como ácido oleico o aceite de soja, glicerol, acetato sódico o similares. Dichas fuentes de carbono pueden utilizarse, por ejemplo, a una concentración de 20 a 300 g por litro de medio. Según una forma de realización particularmente preferida, mediante la alimentación de una fuente de carbono después de consumir la fuente inicial de carbono, puede llevarse a cabo en continuo el cultivo. Mediante la realización del cultivo bajo dichas condiciones, puede incrementarse la cantidad de la fuente de carbono y, de esta manera, puede incrementarse la cantidad producida de la composición que contiene DHA.

Además, como fuente de nitrógeno, puede utilizarse nitrógeno orgánico, tal como extracto de levadura, licor de maceración del maíz, polipeptona, glutamato sódico o urea, o nitrógeno inorgánico, tal como acetato amónico, sulfato amónico, cloruro amónico, nitrato sódico, nitrato amónico o amonio.

Como la sal inorgánica, puede combinarse convenientemente y utilizarse fosfato potásico o similar.

Resulta preferido que el medio que contiene los componentes respectivos anteriormente indicados se utilice mediante esterilización en una autoclave tras ajustar el pH a un intervalo de 4,0 a 9,5 mediante la adición de un ácido o base apropiado.

La temperatura de cultivo es generalmente de 10°C a 45°C, preferentemente de 20°C a 37°C. La temperatura de cultivo preferentemente se controla para que sea una temperatura de cultivo a la que pueda producirse una composición que contiene DHA. El pH durante el cultivo es generalmente de 3,5 a 9,5, preferentemente de 4,5 a 9,5. Un pH particularmente preferido varía dependiendo del propósito deseado y para producir una gran cantidad de un aceite o grasa, el pH es de 5,0 a 8,0.

El periodo de cultivo puede fijarse en, por ejemplo, 2 a 7 días, y el cultivo puede llevarse a cabo mediante cultivo bajo agitación por aireación o similar.

Mediante el cultivo del microorganismo de la presente invención tal como como se ha indicado anteriormente, puede obtenerse un cultivo que contiene el microorganismo en una cantidad de generalmente 50 a 200 g, preferentemente de 100 a 200 g en términos de peso celular seco por litro de medio.

Como método para separar la solución de cultivo y los microorganismos del cultivo, puede llevarse a cabo un método convencional conocido por el experto en la materia y, por ejemplo, la separación puede llevarse a cabo mediante un método de centrifugación, filtración o similar.

Los microorganismos separados del cultivo se homogeneizan mediante, por ejemplo, ultrasonidos, un molino DYNO-MILL o similar, y después, por ejemplo, se lleva a cabo una extracción con solvente, con cloroformo, hexano,

hexano, butanol o similar, de manera que puede obtenerse una composición que contiene DHA.

Mediante el método para producir una composición que contiene DHA de la presente invención, puede obtenerse la composición que contiene DHA en una cantidad de 5 a 100 g, preferentemente de 10 a 80 g por cada 100 g de peso celular seco.

La composición que contiene DHA que debe producirse mediante el método de producción anteriormente indicado se somete a, por ejemplo, un método tal como un método de fraccionamiento con solvente a baja temperatura [Koretaro Takahashi, Journal of Japan Oil Chemist's Society, 40: 931-941 (1991)] o mediante un método de liberación y eliminación de ácidos grasos de cadena corta con una hidrolasa, tal como una lipasa [Koretaro Takahashi, Journal of Japan Oil Chemist's Society, 40: 931-941 (1991)], para concentrar la composición que contiene DHA, de manera que puede obtenerse una composición que contiene DHA que presenta un elevado contenido de DHA.

4. Método para producir DHA de la invención

El método para producir DHA de la presente invención se caracteriza por la separación y recolección de DHA a partir de la composición que contiene DHA obtenida mediante el método de producción indicado en 3, anteriormente.

La separación y recolección de DHA a partir de la composición que contiene DHA puede llevarse a cabo mediante la preparación de ácidos grasos mixtos que contienen DHA a partir de la composición que contiene DHA mediante, por ejemplo, un método de hidrólisis, seguido de la separación y recolección de DHA mediante, por ejemplo, un método de adición de urea, un método de separación mediante enfriamiento, cromatografía líquida de alto rendimiento, cromatografía de fluidos supercríticos o similares.

5. Método para producir alquil-éster de DHA de la invención

El método para producir alquil-éster de DHA de la presente invención se caracteriza por la separación y recolección de DHA a partir de la composición que contiene DHA obtenida mediante el método de producción indicado en 3, anteriormente.

El alquil-éster de DHA no se encuentra particularmente limitado con la condición de que sea alquil-éster de DHA; sin embargo, entre los ejemplos del mismo se incluyen preferentemente metil-éster de DHA o etil-éster de DHA, más preferentemente etil-éster de DHA.

La separación y recolección del alquil-éster de DHA a partir de la composición que contiene DHA puede llevarse a cabo mediante la preparación de alquil-ésteres de ácidos grasos mixtos que contienen DHA a partir de la composición que contiene DHA mediante, por ejemplo, un método de alcoholisis, seguido de la separación y recolección de alquil-éster de DHA mediante, por ejemplo, un método de adición de urea, un método de separación mediante enfriamiento, cromatografía líquida de alto rendimiento, cromatografía de fluidos supercríticos o similares.

A continuación en la presente memoria, se muestran ejemplos de la invención de la presente solicitud; sin embargo, la presente invención no se encuentra limitada a estos ejemplos.

Ejemplo 1

Obtención del microorganismo de la invención (1)

1. Aislamiento del microorganismo de la invención

Como muestra, a partir de la que se aísla el microorganismo de la presente invención, se utilizaron hojas caídas recogidas del suelo de un manglar (una zona de aguas salobres) próxima a una zona costera en Okinawa. Las hojas caídas se sumergieron en agua marina artificial que contenía penicilina G y estreptomicina a una concentración de 300 mg/l y después, el sobrenadante del agua marina artificial se aplicó sobre un medio agar para el aislamiento que contenía penicilina G y estreptomicina (cada uno a una concentración de 300 mg/l) y se incubó a 25°C durante varios días.

Como medio agar para el aislamiento, se utilizó un medio agar que presentaba la composición siguiente: 0.2% de glucosa, 0.02% de extracto de levadura, 50% de agua marina artificial, 0.05% de glutamato sódico y 1.5% de agarosa.

Tras confirmar la aparición de muchas colonias sobre la placa de agar, se separaron las colonias y se cultivaron en un medio líquido para la evaluación a 30°C durante 48 horas.

Como medio líquido para la evaluación, se utilizó un medio líquido que presentaba la composición siguiente: 9%

de glucosa, 1% de extracto de levadura, 1% de peptona y 50% de agua marina artificial.

A partir de la solución de cultivo, se extrajo un líquido utilizando el método de Bligh y Dyer (Bligh E.G. y Dyer W.J., Can. J. Biochem. Physiol. 37 911 (1959)) y se secó bajo presión reducida. A continuación, el lípido seco se sometió a metilación de los ácidos grasos utilizando un kit de metilación de ácidos grasos (Nacalai Tesque, Inc.) y el metil-éster de ácido graso obtenido mediante dicho tratamiento se extrajo con n-hexano. Dicho metil-éster de ácido graso se analizó mediante cromatografía de gases y se examinó la cantidad y composición de los ácidos grasos en la solución de cultivo.

Las condiciones para la cromatografía de gases se fijaron de la manera siguiente.

- Columna: HR-SS-10 (Shinwa Chemical Industries Ltd.), 0.25 mm x 25 m
- Gas portador: He, 30 ml/min
- Temperatura de la columna: 190°C
- Detección: FID

Según el procedimiento anterior, pudieron obtenerse 1239 cepas de microorganismos productores de DHA a partir de 5000 o más cepas de organismos derivados de manglar.

El contenido de DHA y la proporción de DHA a ácidos grasos totales en el cultivo de cada uno de los microorganismos productores de DHA obtenidos en este momento se muestran en la figura 1. A partir de la figura 1 se confirmó que existe una tendencia a que generalmente se incrementa la proporción de DHA, se deteriore el crecimiento, de manera que se reduce la cantidad de ácidos grasos totales y se reduce el contenido de DHA, y se confirmó que la proporción de DHA en las cepas que producen una gran cantidad de ácidos grasos se concentraba a aproximadamente 30% a 40%, tal como es conocido. De entre ellas, se seleccionó una cepa que crecía bien y que mostraba una productividad de DHA elevada, y se denominó "cepa OH4".

2. Características morfológicas de la cepa OH4

La cepa OH4 es unicelular y puede crecer en presencia de penicilina G y estreptomycin y, por lo tanto, se concluye que la cepa OH4 es un eucariota unicelular. Además, basándose en el hecho de que se aisló la cepa OH4 a partir de una muestra derivada del suelo del manglar y de que el contenido de DHA era muy elevado, se presumió que la cepa OH4 era un traustokuitrido perteneciente a los Heterokonta.

En la cepa OH4, pudo observarse una red ectoplásmica que se extendía desde una célula esférica con un diámetro de 10 a 20 µm en el medio agar anteriormente indicado para el aislamiento y, por lo tanto, se confirmó que la cepa OH4 pertenece a la familia *Thraustochytriaceae* de la clase *Labyrinthulea* del reino *Chromista*. Además, se confirmó que las células vegetativas presentan una forma esférica y proliferan mediante fisión binaria de los microorganismos. Dicha historia vital es característica del género *Aurantiochytrium* (Yokoyama R. et. al., Mycoscience 48: 329-341; Daisuke Honda, Phylogeny and Taxonomy of the Labyrinthula, Kaiyo to Seibutsu (Aquabiology), 23: 7-18, 2001). En la figura 2 se muestra una fotomicrografía de la cepa OH4.

3. Características biológicas moleculares de la cepa OH4

Se recuperó la cepa OH4 cultivada mediante la utilización del medio líquido anteriormente indicado para la evaluación en la etapa de crecimiento logarítmica y se extrajo el ADN genómico total mediante un procedimiento común utilizando perlas de vidrio y fenol-cloroformo. Se llevó a cabo una reacción de PCR utilizando el ADN genómico obtenido como molde y oligonucleótidos que consistían en las secuencias de bases representadas mediante las SEC ID nº 6 y nº 7, respectivamente, como un conjunto de cebadores, y se amplificó un gen de ARNr 18S. La secuencia de bases del producto de PCR obtenido se determinó mediante el método de Sanger.

En este método, en el procedimiento de determinación de la secuencia de bases del gen de ARNr 18S de la cepa OH4, se encontró que la molécula era polimórfica. Es un fenómeno convencionalmente conocido que la secuencia del gen de ARNr 18S de un microorganismo *Labyrinthulea* es polimórfica (documento de patente nº 7). Las secuencias de bases de los genes de ARNr 18S de la cepa OH4 se representan mediante las SEC ID nº 1 a nº 5, respectivamente.

Además, las diferencias en las secuencias polimórficas respectivas se muestran en la tabla 1. Se muestran los números de bases basados en la SEC ID nº 4, que es la secuencia más larga.

Tabla 1 Comparación de las secuencias génicas de ARNr 18S de la cepa OH4

Número de base	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259
SEC ID nº 1	C	-	T	-	A	T	T	T	T	G
SEC ID nº 2	C	-	T	-	T	T	T	T	T	G
SEC ID nº 3	C	-	T	A	T	T	T	T	T	G

Número de base	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259
SEC ID nº 4	C	A	T	T	T	T	T	T	A	G
SEC ID nº 5	C	-	T	T	T	T	T	A	A	G

Las secuencias de bases representadas mediante las SEC ID nº 1 a nº 5 se buscaron utilizando el algoritmo BLAST de Karlin y Altschul [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 5873 (1993) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)]. Como resultado, dichas secuencias de bases mostraron una identidad de 99% respecto a las secuencias de bases de los genes de ARNr 18S de *Aurantiochytrium* sp. cepa KRS101 y de *Aurantiochytrium* sp. cepa BL11.

Por otra parte, no se encontraron secuencias que se correspondiesen por completo con ninguna de las secuencias de bases representadas mediante las SEC ID nº 1 a nº 5 en la base de datos NCBI.

Basándose en las características morfológicas y características biológicas moleculares anteriormente indicadas, se concluyó que la cepa OH4 es un microorganismo nuevo perteneciente al género *Aurantiochytrium* y denominado "*Aurantiochytrium* sp. cepa OH4", y depositado en el depósito de microorganismos de patentes del National Institute of Technology and Evaluation (NITE) (Central 6, 1-1, Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japón) el 11 de enero de 2013 bajo el número de acceso FERM BP-11524.

Por otra parte, la clasificación podría cambiar por el avance de la investigación en el futuro; sin embargo, el microorganismo de la presente invención todavía es un nuevo microorganismo.

Ejemplo 2

Obtención de microorganismos mutantes utilizando el microorganismo de la invención (2)

1. Adquisición de mutante obtenido mediante la utilización de *Aurantiochytrium* sp. cepa OH4 como cepa parental

Se sometió la cepa OH4 de *Aurantiochytrium* sp. A un tratamiento de mutación con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) de manera que la tasa de mortalidad fuese de 99.9%. A continuación, se aisló una colonia superviviente y se cultivó en un medio líquido para la evaluación a 30°C durante 48 horas. Como resultado, pudo obtenerse una cepa en la que la proporción de DHA se había incrementado en aproximadamente 1,6 veces, y junto a ello, se había incrementado el contenido de DHA en aproximadamente 3 veces. Esta cepa se denominó "*Aurantiochytrium* sp. cepa LTR23".

La figura 3 es una vista en la que el contenido de DHA y la proporción de DHA a ácidos grasos totales en el cultivo de *Aurantiochytrium* sp. cepa LTR23 se ha añadido a la figura 1. A partir de la figura 3 pudo confirmarse que *Aurantiochytrium* sp. cepa LTR23 presenta una proporción de DHA más elevada y asimismo un contenido de DHA más elevado que un aislado espontáneo.

Ejemplo 3

Producción industrial de composición que contiene DHA de la invención

1. Cultivo de *Aurantiochytrium* sp. cepa OH4 y cepa LTR23

Se cultivó cada una de *Aurantiochytrium* sp. cepa OH4 y cepa LTR23 en un fermentador de tanque. Además, para la comparación, se cultivaron bajo las mismas condiciones *Aurantiochytrium limacinum* cepa SR21 (documentos de patente nº 4 a nº 6 y documento no de patente nº 4) y *Schizochytrium* sp. cepa S31 (documento de patente nº 9), los cuales se ha informado que son microorganismos de producción elevada de DHA.

Aurantiochytrium limacinum cepa SR21 (ATCC nº MYA-1381) y *Schizochytrium* sp. cepa S31 (ATCC nº 20888) se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC).

Cada una de las cepas microbianas criopreservadas anteriormente indicadas se inoculó en el medio agar para el aislamiento utilizado en el ejemplo 1. Tras confirmar que los microorganismos crecían suficientemente, se desprendieron del medio mediante raspado y se inocularon en el medio líquido para la evaluación utilizado en el ejemplo 1 para llevar a cabo el cultivo de siembra. Tras confirmar que los microorganismos crecían suficientemente mediante el cultivo de siembra, se inocularon los microorganismos en un fermentador de tanque de 3 l. La composición del medio en el fermentador de tanque de 3 l estaba de acuerdo con la del documento de patente nº 9.

Es decir, se preparó un medio compuesto de sulfato sódico (12 g/l), KCl (0.5 g/l), MgSO₄·7H₂O (2 g/l), antiespumante Hodag K-60 (0.35 g/l), K₂SO₄ (0.65 g/l), KH₂PO₄ (1 g/l), (NH₄)₂SO₄ (1 g/l), CaCl₂·2H₂O (0.17 g/l), MnCl₂·4H₂O (3 mg/l), ZnSO₄·7H₂O (3 mg/l), CoCl₂·6H₂O (0.04 mg/l), Na₂MoO₄·2H₂O (0.04 mg/l), CuSO₄·5H₂O (2 mg/l), NiSO₄·6H₂O (2 mg/l), FeSO₄·7H₂O (10 mg/l), tiamina (9.5 mg/l), vitamina B12 (0.15 mg/l) y pantotenato cálcico (3.2 mg/l).

Los cambios fueron los siguientes: debido a que el consumo de azúcar de *Aurantiochytrium* sp. cepa OH4 y cepa LTR23 es elevado, se fijó la concentración de glucosa en 120 g/l y, además, como fuente de nitrógeno, se utilizó una solución de NH₄OH al 28%. En el estadio en que los 120 g/l de glucosa en el medio se habían consumido por completo, se alimentó adicionalmente al medio una solución de glucosa a una concentración de 65% y se llevó a cabo el cultivo en continuo durante un máximo de 85 horas.

A partir del cultivo obtenido, de la misma manera que en el ejemplo 1, se extrajo un lípido mediante el método de Bligh y Dyer, seguido de metilación, y el lípido se analizó mediante cromatografía de gases.

Los microorganismos obtenidos se congelaron a -80°C, seguido de liofilización, obteniendo de esta manera microorganismos secos. El peso de los microorganismos secos obtenidos de esta manera se midió y se convirtió en la cantidad original de la solución de cultivo, calculando de esta manera el peso celular seco (PCS) en el cultivo.

Se resumen los resultados del cultivo en la tabla 2 a continuación.

Tabla 2 Resultados del cultivo en fermentador de tanque

	Unidades	OH4	LTR23	SR21	S31
Peso celular seco	g/l	145.3	133.8	118.3	90
Contenido de DHA	g/l	26	44	18	8.7
DHA/ácidos grasos totales	%	27	52	26	44
Productividad de DHA	g/l/h	0.294	0.505	0.211	0.402

Como resultado del cultivo, en el caso de *Aurantiochytrium* sp. cepa OH4, el peso celular seco era de 145.3 g/l de cultivo, y el contenido de DHA era de 26 g/l de cultivo, que resultó ser significativamente más elevado que en los microorganismos de los que se ha informado como microorganismos de elevada producción de DHA. Debido a que el DHA se acumula en los microorganismos, un peso celular seco elevado presenta la ventaja de que la cantidad de DHA que puede recolectarse finalmente es elevada.

Además, en el caso de *Aurantiochytrium* sp. cepa LTR23, el contenido de DHA era de 44 g/l de cultivo, la composición de DHA en los ácidos grasos totales era de 52% y la productividad de DHA era de 0.505 g/l/h y, de esta manera, se demostró que *Aurantiochytrium* sp. cepa LTR23 sobrepasa a *Aurantiochytrium* sp. cepa OH4 y los microorganismos de los que se ha informado como microorganismos de producción elevada de DHA.

2. Composición de ácidos grasos en *Aurantiochytrium* sp. cepa OH4 y cepa LTR23

La composición de ácidos grasos en *Aurantiochytrium* sp. cepa OH4 y cepa LTR23 cultivadas en el fermentador de tanque se muestran en la tabla 3, a continuación. Los valores para *Schizochytrium* sp. cepa S31 se han reimpresso del documento no de patente nº 2.

Tabla 3 Composición de ácidos grasos

	OH4	LTR23	S31 (valores en el documento)
12:0	1.9	1.8	0-0.5
14:0	5.1	1.4	9-15
16:0	59.8	26.3	24-28
16:1	0.3	0.3	0.2-0.5
18:0	1.7	1.1	0.5-0.7
20:3 (n-6)	0.0	0.3	0-0.5
20:4 (n-3)	0.9	0.3	0.5-1
20:5 (n-3)	0.3	0.3	-
22:5 (n-6)	4.4	16.0	11-14
22:6 (DHA)	25.6	52.1	35-40

A partir de los resultados anteriores, se demostró que, en la composición de ácidos grasos de *Aurantiochytrium* sp. cepa LTR23, se reduce el nivel de ácido palmítico y de los ácidos grasos saturados de cadena corta, y se incrementa el nivel de ácidos grasos poliinsaturados tales como DHA y 22:5 (n-6). Es conocido que los ácidos grasos saturados incrementan el colesterol-LDL y la proporción de colesterol total a colesterol-HDL, y se señala que existe una posibilidad de que se incremente el riesgo de diabetes. Por lo tanto, asimismo desde el punto de vista nutricional, se demuestra la significación de *Aurantiochytrium* sp. cepa LTR23.

3. Estabilidad de *Aurantiochytrium* sp. cepa LTR23.

Se obtuvo *Aurantiochytrium* sp. cepa LTR23 mediante la introducción de una mutación y, por lo tanto, existía potencialmente el problema de que el rasgo fuese inestable. A partir de lo anterior, se examinó la estabilidad del rasgo mediante la repetición del subcultivo múltiples veces y llevando a cabo el cultivo de la misma manera que anteriormente en 1, utilizando las cepas subcultivadas. Se resumen los resultados del cultivo en la tabla 4 a continuación.

Tabla 4. Estabilidad de *Aurantiochytrium* sp. cepa LTR23

	Contenido de DHA	DHA/ácidos grasos totales
Unidades	(g/l)	(%)
Primer subcultivo	47	52
Segundo subcultivo	37	51
Tercer subcultivo	41	53
Cuarto subcultivo	44	51
Quinto subcultivo	44	52
Media	42.6	51.8
Desviación estándar	3.8	0.8
Coefficiente de variación (%)	8.9	1.6

El coeficiente de variación era de 10% o inferior tanto en la cantidad producida de DHA como en la proporción de DHA y, por lo tanto, se demostró que no existía ningún problema de estabilidad de *Aurantiochytrium* sp. cepa LTR23.

Aplicabilidad industrial

Según la presente invención, se proporciona un microorganismo que presenta una capacidad más elevada de producir DHA que anteriormente. Además, se proporcionan métodos eficientes para producir una composición que contiene DHA, DHA y alquil-éster de DHA utilizando el microorganismo.

Descripción de números de referencia y signos

En las figuras 1 y 3, los círculos abiertos (○) indican microorganismos productores de DHA recolectados del suelo de un manglar (una zona de aguas salobres) próxima a una zona costera en Okinawa.

En la figura 3, los cuadrados negros (■) indican *Aurantiochytrium* sp. cepa LTR23.

Texto libre de listado de secuencias

SEC ID nº 6 - Descripción de secuencia artificial: ADN sintético
SEC ID nº 7 - Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

Listado de secuencias

<110> KYOWA HAKKO BIO CO., LTD.

<120> Microorganismos productores de ácido docosahexaenoico y utilización de los mismos.

<130> Y2130 EP S3

<140> EP 14 74 1072.4

<141> 2014-01-17

<160> 7

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1672

<212> ADN

<213> *Aurantiochytrium* sp.

<220>

<221> gen
<222> (1)..(1672)

<400> 1

5
tctggttgat cctgccagta gtcatatgct cgtctcaaag attaagccat gcatgtgtaa 60
gtataagcga ttgtactgtg agactgcgaa cggctcatta tatcagtaat aatttccttcg 120
gtagtttctt ttatatggat acctgcagta attctggaaa taatacatgc tgtaagagcc 180
ctgtatgggg ctgcacttat tagattgaag ccgattttat tgggtgaatca tgataattga 240
gcagattgac tattttgtcg atgaatcggt tgagtttctg ccccatcagt tgtcgacggg 300
agtgtattgg actacgggta ctataacggg tgacggagag ttagggctcg actccggaga 360
gggagcctga gagacggcta ccatatccaa ggatagcagc aggcgcgtaa attaccact 420
gtggactcca cgaggtagtg acgagaaata tcgatgcgag gcgtgtatgc gttttgctat 480
cggaatgaga gcaatgtaaa accctcatcg aggatcaact ggagggcaag tctggtgcc 540
gcagcccgcg taattccagc tccagaagca tatgctaaag ttgttgacgt taaaaagctc 600
gtagttgaat ttctggcatg ggcgaccggg gctttccctg aatggggatt gattgtctgt 660
gttgcccttg ccatcttttt cttttcttta ttgatgagaa atctttcact gtaatcaaag 720
cagagtgttc caagcaggtc gtatgaccgg tatgtttatt atgggatgat aagataggac 780
ttgggtgcta ttttgttggt ttgcacgcct gagtaatggg taataggaac agttgggggt 840
attcgtattt aggagctaga ggtgaaattc ttggatttcc gaaagacgaa ctagagcgaa 900
ggcatttacc aagcatgttt tcattaatca agaacgaaag tctggggatc gaagatgatt 960
agataccatc gtagtctaga ccgtaaacga tgccgacttg cgattgttg gtgctttttt 1020
atgggcctca gcagcagcac atgagaaatc aaagtctttg ggttccgggg ggagtatggt 1080
cgcaaggctg aaacttaag gaattgacgg aagggcacca ccaggagtgg agcctgcggc 1140
ttaatttgac tcaacacggg aaaacttacc aggtccagac ataggtagga ttgacagatt 1200
gagagctctt tcatgattct atgggtggtg gtgcatggcc gttcttagtt ggtggagtga 1260
tttgtctggt taattccgtt aacgaacgag acctcggcct actaaatagt gcgtgggatg 1320
gcaacatagt gcgttttaac ttcttagagg gacatgtccg gtttacgggc aggaagtctg 1380
aggcaataac aggtctgtga tgcccttaga tgttctgggc cgcacgcgcg ctacactgat 1440
gggttcacg ggttttaatt ctattttttg gaattgagt cttggtcgga aggcctggct 1500
aatccttgga acgctcatcg tgctggggct agatttttgc aattattaat ctccaacgag 1560
gaattcctag taaacgcaag tcatcagctt gcattgaata cgtccctgcc cttgtacac 1620
accgcccgtc gcacctaccg attgaacggg ccgatgaaac catgggatgt tt 1672

10 <210> 2
<211> 1672
<212> ADN
<213> Aurantiochytrium sp.

15 <220>
<221> gen
<222> (1)..(1672)

ES 2 762 618 T3

<400> 2

tctggttgat	cctgccagta	gtcatatgct	cgtctcaaag	attaagccat	gcatgtgtaa	60
gtataagcga	ttgtactgtg	agactgcgaa	cggctcatta	tatcagtaat	aatttcttcg	120
gtagtttctt	ttatatggat	acctgcagta	attctggaaa	taatacatgc	tgtaagagcc	180
ctgtatgggg	ctgcacttat	tagattgaag	ccgattttat	tggtgaatca	tgataattga	240
gcagattgac	ttttttgtcg	atgaatcggt	tgagtttctg	cccatcaggt	tgctcgacggt	300
agtgtattgg	actacgggtg	ctataacggg	tgacggagag	ttagggctcg	actccggaga	360
gggagcctga	gagacggcta	ccatatccaa	ggatagcagc	aggcgcgtaa	attaccact	420
gtggactcca	cgaggtagtg	acgagaaata	tcgatgcgag	gcgtgtatgc	gttttgctat	480
cggaatgaga	gcaatgtaaa	accctcatcg	aggatcaact	ggagggcaag	tctggtgcca	540
gcagccgcgg	taattccagc	tccagaagca	tatgctaaag	ttgttgagct	taaaaagctc	600
gtagttgaat	ttctggcatg	ggcgaccggt	gctttccctg	aatggggatt	gattgtctgt	660
gttgcccttg	ccatcttttt	cttttcttta	ttgatgagaa	atctttcact	gtaatcaaag	720
cagagtgttc	caagcaggtc	gtatgaccgg	tatgtttatt	atgggatgat	aagataggac	780
ttgggtgcta	ttttgttggt	ttgcacgcct	gagtaatggt	taataggaac	agttgggggt	840
attcgtattt	aggagctaga	ggtgaaattc	ttggatttcc	gaaagacgaa	ctagagcgaa	900
ggcatttacc	aagcatgttt	tcattaatca	agaacgaaag	tctggggatc	gaagatgatt	960
agataccatc	gtagtctaga	ccgtaaacga	tgccgacttg	cgattgttgg	gtgctttttt	1020
atgggacctc	gcagcagcac	atgagaaatc	aaagtctttg	ggttccgggg	ggagtatggt	1080
cgcaaggctg	aaacttaaa	gaattgacgg	aagggcacca	ccaggagtgg	agcctgcggc	1140
ttaatttgac	tcaacacggg	aaaacttacc	aggtccagac	ataggtagga	ttgacagatt	1200
gagagctctt	tcatgattct	atgggtggtg	gtgcatggcc	gttcttagtt	ggtggagtga	1260
tttgtctggt	taattccggt	aacgaacgag	acctcggcct	actaaatagt	gcgtgggatg	1320
gcaacatagt	gcgttttaac	ttcttagagg	gacatgtccg	gtttacgggc	aggaagttcg	1380
aggcaataac	aggtctgtga	tgcccttaga	tggtctgggc	cgacgcgcg	ctacactgat	1440
gggttcatcg	ggttttaatt	ctattttttg	gaattgagtg	cttggtcgga	aggcctggct	1500
aatccttggg	acgtctcatg	tgctggggct	agatttttgc	aattattaat	ctccaacgag	1560
gaattcctag	taaacgcaag	tcatcagctt	gcattgaata	cgtccctgcc	ctttgtacac	1620
5 accgcccgtc	gcacctaccg	attgaacggg	ccgatgaaac	catgggatgt	tt	1672

<210> 3

<211> 1673

<212> ADN

10 <213> Aurantiochytrium sp.

<220>

<221> gen

<222> (1)..(1673)

15

<400> 3

ES 2 762 618 T3

```

tctgggtgat cctgccagta gtcatatgct cgtctcaaag attaagccat gcatgtgtaa      60
gtataagcga ttgtactgtg agactgcgaa cggctcatta tatcagtaat aattttcttcg    120
gtagtttctt ttatatggat acctgcagta attctggaaa taatacatgc tgtaagagcc     180
ctgtatgggg ctgcacttat tagattgaag ccgattttat tggatgaatca tgataattga    240
gcagattgac tattttttgtc gatgaatcgt ttgagtttct gcccacatcag ttgtcgacgg    300
tagtgtattg gactacggtg actataacgg gtgacggaga gttagggctc gactccggag     360
agggagcctg agagacggct accatatcca aggatagcag caggcgcgta aattaccac      420
tgtggactcc acgaggtagt gacgagaaat atcgatgcga ggcggtgatg cgttttgcta     480
tcggaatgag agcaatgtaa aaccctcatc gaggatcaac tggagggcaa gtctgggtgcc    540
agcagccgcg gtaattccag ctccagaagc atatgctaaa gttgttgacg ttaaaaagct     600
cgtagttgaa tttctggcat gggcgaccgg tgctttccct gaatggggat tgattgtctg    660
tgttgccttg gccatctttt tcttttcttt attgatgaga aatctttcac tgtaatcaaa    720
gcagagtgtt ccaagcaggt cgtatgaccg gtatgtttat tatgggatga taagatagga    780
cttgggtgct attttggttg tttgcacgcc tgagtaatgg ttaataggaa cagttggggg    840
tattcgattt taggagctag aggtgaaatt cttggatttc cgaaagacga actagagcga     900
aggcatttac caagcatgtt ttcattaatc aagaacgaaa gtctggggat cgaagatgat     960
tagataccat cgtagtctag accgtaaacg atgccgactt gcgattgttg ggtgcttttt   1020
tatgggcctc agcagcagca catgagaaat caaagtcttt gggttccggg gggagtatgg   1080
tcgcaaggct gaaacttaaa ggaattgacg gaagggcacc accaggagtg gagcctgcgg   1140
cttaatttga ctcaacacgg gaaaacttac caggtccaga cataggtagg attgacagat   1200
tgagagctct ttcattgattc tatgggtggg ggtgcatggc cgttcttagt tgggtggagt   1260
atgtgtctgg ttaattccgt taacgaacga gacctcggcc tactaaatag tgcgtgggat   1320
ggcaacatag tgcgttttaa cttcttagag ggacatgtcc ggtttacggg caggaagttc   1380
gaggcaataa caggtctgtg atgcccttag atgttctggg ccgcacgcgc gctacactga   1440
tgggttcac cgggtttta tctatttttt ggaattgagt gcttggtcgg aaggcctggc   1500
taatccttgg aacgctcatc gtgctggggc tagatttttg caattattaa tctccaacga   1560
ggaattccta gtaaacgcaa gtcacagct tgcatgaat acgtccctgc cctttgtaca   1620
caccgcccgt cgcacctacc gattgaacgg tccgatgaaa ccatgggatg ttt         1673

```

5 <210> 4
 <211> 1674
 <212> ADN
 <213> Aurantiochytrium sp.

10 <220>
 <221> gen
 <222> (1)..(1674)

15 <400> 4

ES 2 762 618 T3

```

tctggttgat cctgccagta gtcatatgct cgtctcaaag attaagccat gcatgtgtaa      60
gtataagcga ttgtactgtg agactgcgaa cggctcatta tatcagtaat aatttcttcg      120
gtagtttctt ttatatggat acctgcagta attctggaaa taatacatgc tgtaagagcc      180
ctgtatgggg ctgcacttat tagattgaag ccgattttat tggatgaatca tgataattga      240
gcagattgac attttttagt cgatgaatcg tttgagtttc tgcccatca gttgtcgacg      300
gtagtgtatt ggactacggt gactataacg ggtgacggag agttagggct cgactccgga      360
gagggagcct gagagacggc taccatatcc aaggatagca gcaggcgcgt aaattaccca      420
ctgtggactc cacgaggtag tgacgagaaa tatcgatgcg aggcgtgtat gcgttttgct      480
atcggaatga gagcaatgta aaaccctcat cgaggatcaa ctggagggca agtctggtgc      540
cagcagccgc ggtaattcca gctccagaag catatgctaa agttgttgca gttaaaaagc      600
tcgtagttag atttctggca tgggcgaccg gtgctttccc tgaatgggga ttgattgtct      660

gtgttgccct ggccatcttt ttcttttctt tattgatgag aaatctttca ctgtaatcaa      720
agcagagtgt tccaagcagg tcgtatgacc ggtatgttta ttatgggatg ataagatagg      780
acttggtgac tattttgttg gtttgacgcg ctgagtaatg gttaatagga acagttgggg      840
gtattcgtat ttaggagcta gaggtgaaat tcttggtatt ccgaaagacg aactagagcg      900
aaggcattta ccaagcatgt ttccattaat caagaacgaa agtctgggga tcgaagatga      960
ttagatacca tcgtagtcta gaccgtaaac gatgccgact tgcgattgtt ggggtccttt      1020
ttatgggcct cagcagcagc acatgagaaa tcaaagtctt tgggttccgg ggggagtatg      1080
gtcgcaaggc tgaaacttaa aggaattgac ggaagggcac caccaggagt ggagcctgcg      1140
gcttaatttg actcaacacg ggaaaactta ccagggtccag acataggtag gattgacaga      1200
ttgagagctc tttcatgatt ctatgggtgg tggatgcatg ccgttcttag ttggtggagt      1260
gatttgctct gttaattccg ttaacgaacg agacctcggc ctactaaata gtgcgtggta      1320
tggcaacata gtgcgtttta acttcttaga gggacatgtc cggtttacgg gcaggaagtt      1380
cgaggcaata acaggtctgt gatgccctta gatgttctgg gccgcacgcg cgctacactg      1440
atgggttcat cgggttttaa ttctattttt tgggaattgag tgcttggtcg gaaggcctgg      1500
ctaactcttg gaacgctcat cgtgctgggg ctagattttt gcaattatta atctccaacg      1560
aggaattcct agtaaacgca agtcatcagc ttgcattgaa tacgtccctg ccctttgtac      1620
acaccgcccg tcgcacctac cgattgaacg gtccgatgaa accatgggat gttt      1674

```

5 <210> 5
 <211> 1673
 <212> ADN
 <213> Aurantiochytrium sp.

10 <220>
 <221> gen
 <222> (1)..(1673)

15 <400> 5

ES 2 762 618 T3

tctggttgat cctgccagta gtcatatgct cgtctcaaag attaagccat gcatgtgtaa 60
gtataagcga ttgtactgtg agactgcgaa cggctcatta tatcagtaat aatttcttcg 120
gtagtttctt ttatatggat acctgcagta attctggaaa taatacatgc tgtaagagcc 180
ctgtatgggg ctgcacttat tagattgaag ccgattttat tggatgaatca tgataattga 240
gcagattgac tttttaagtc gatgaatcgt ttgagtttct gcccacatcag ttgtcgacgg 300
tagtgtattg gactacgggt actataacgg gtgacggaga gttagggtct gactccggag 360
agggagcctg agagacggct accatatcca aggatagcag caggcgcgta aattaccac 420
tgtggactcc acgaggtagt gacgagaaat atcgatgcga ggcgtgtatg cgttttgcta 480
tcggaatgag agcaatgtaa aaccctcatc gaggatcaac tggagggcaa gtctggtgcc 540
agcagccgcg gtaattccag ctccagaagc atatgctaaa gttgttgacg ttaaaaagct 600
cgtagtgtgaa tttctggcat gggcgaccgg tgctttccct gaatggggat tgattgtctg 660
tgttgccctg gccatctttt tcttttcttt attgatgaga aatctttcac tgtaatcaaa 720
gcagagtgtt ccaagcaggt cgtatgaccg gtatgtttat tatgggatga taagatagga 780
cttggtgtct attttggttg tttgcacgcc tgagtaatgg ttaataggaa cagttggggg 840
tattcgtatt taggagctag aggtgaaatt cttggatttc cgaaagacga actagagcga 900
aggcatttac caagcatgtt ttcatataatc aagaacgaaa gtctggggat cgaagatgat 960
tagataccat cgtagtctag accgtaaaacg atgccgactt gcgattgttg ggtgcttttt 1020
tatgggcctc agcagcagca catgagaaat caaagtcttt gggttccggg gggagtatgg 1080
tcgcaaggct gaaacttaaa ggaattgacg gaagggcacc accaggagtg gagcctgcgg 1140
cttaatttga ctcaacacgg gaaaacttac caggtccaga cataggtagg attgacagat 1200
tgagagctct ttcatgattc tatgggtggt ggtgcattggc cgttcttagt tgggtggagt 1260
atgtgtctgg ttaattccgt taacgaacga gacctcgcc tactaaatag tgcgtggtat 1320
ggcaacatag tgcgttttaa cttcttagag ggacatgtcc ggtttacggg caggaagtct 1380
gaggcaataa caggtctgtg atgcccttag atgttctggg ccgcacgcgc gctacactga 1440
tgggttcac cgggtttta tctatttttt ggaattgagt gcttggtcgg aaggcctggc 1500
taatccttg aacgctcatc gtgctggggc tagatttttg caattattaa tctccaacga 1560
ggaattccta gtaaacgcaa gtcacagct tgcattgaat acgtccctgc ctttgtaca 1620
caccgcccgt cgcacctacc gattgaacgg tccgatgaaa ccatgggatg ttt 1673

5 <210> 6
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> ADN sintético
<400> 6

15 tctggttgat cctgccagta gtc 23
<210> 7
<211> 25

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ADN sintético

<400> 7

aaacatccca tggtttcacg ggacc

25

10

REIVINDICACIONES

1. Microorganismo que pertenece al género *Aurantiochytrium* que presenta un gen de ARNr 18S que consiste en la secuencia de bases representada mediante cualquiera de las SEC ID nº 1 a 5.
2. *Aurantiochytrium* sp. cepa OH4 (número de acceso: FERM BP-11524).
3. Método para producir una composición que contiene DHA, que comprende cultivar el microorganismo según la reivindicación 1 o 2 en un medio, permitir que la composición que contiene DHA sea producida y acumulada en un cultivo y recoger la composición que contiene DHA a partir del cultivo.
4. Método para producir DHA que comprende separar y recoger DHA a partir de la composición que contiene DHA recogida según la reivindicación 3.
5. Método para producir alquil éster de DHA que comprende separar y recoger alquil éster de DHA a partir de la composición que contiene DHA recogida según la reivindicación 4.

Fig. 1

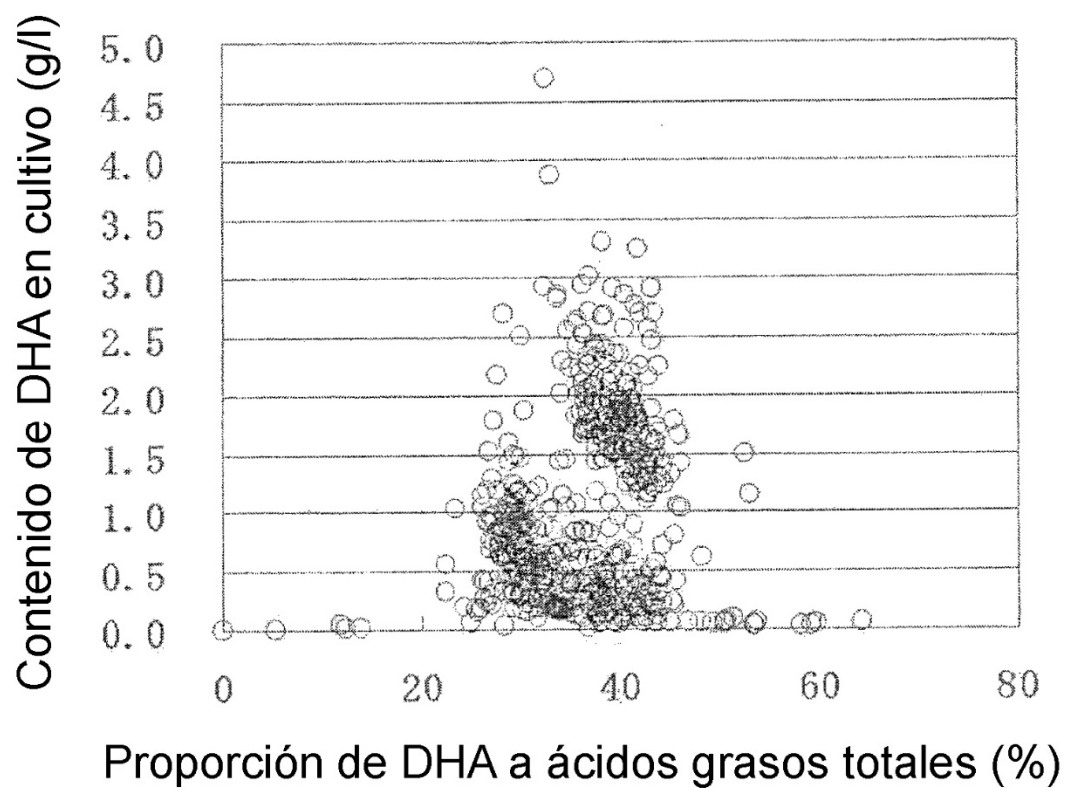


Fig. 2

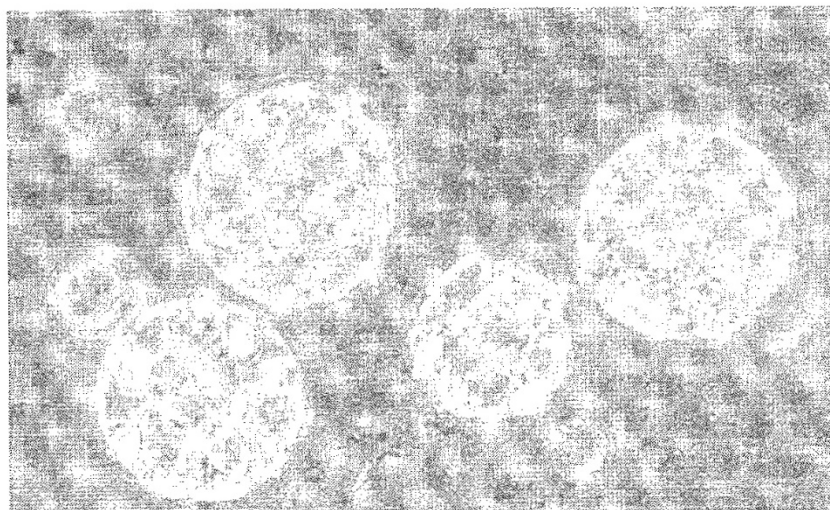


Fig. 3

