(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 774 463**

(51) Int. CI.:

C12N 1/12 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
C12N 9/96 (2006.01)
A61K 38/44 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.05.2016 PCT/EP2016/060131**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **10.11.2016 WO16177853**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.05.2016 E 16725049 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 3292197**

(54) Título: **Método para obtener una biomasa de una microalga de la especie Tetraselmis chuii enriquecida en superóxido dismutasa (SOD)**

(30) Prioridad:

06.05.2015 EP 15382235

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.07.2020

(73) Titular/es:

FITOPLANCTON MARINO S.L. (100.0%)
Muelle pesquero, Darsena comercial, s/n
11500 El Puerto de Santa Maria, ES

(72) Inventor/es:

UNAMUNZAGA ESCOSURA, CARLOS y
MANTECÓN GÁLVEZ, EULALIA

(74) Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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

Método para obtener una biomasa de una microalga de la especie *Tetraselmis chuii* enriquecida en superóxido dismutasa (SOD)

Campo de la invención

La invención se refiere a una biomasa de una microalga de la especie *Tetraselmis chuii* enriquecida en superóxido dismutasa (SOD), un método para obtener la misma, un método para purificar SOD de dicha biomasa, un extracto de proteína enriquecido en SOD, y sus usos. La invención también se refiere al uso de una solución de salmuera específica rica en magnesio como un estabilizador de SOD comprendida en una biomasa de una microalga que contiene SOD, así como a una biomasa de una microalga de la especie *T. chuii* enriquecida en SOD en donde SOD se estabiliza con dicha salmuera.

Antecedentes de la invención

Las enzimas microbianas y animales fueron una vez la elección principal de la industria, que ofrecían productos económicos, funcionales de calidad aceptable. Sin embargo, debido a atención negativa de los medios, asociada con los productos microbianos y derivados de animales, los consumidores están pidiendo una alternativa. Los químicos de alimentos y cosméticos actuales se enfrentan con el reto de sustituir enzimas derivadas de animales tradicionales con otras que ofrezcan la misma funcionalidad, pero deriven de fuentes “verdes” naturales (por ejemplo, algas). La diversidad de microalgas promete proporcionar enzimas y biocatalizadores nuevos y diversos y tiene el potencial de hacer la biotecnología industrial un éxito económico, sostenible. Hasta ahora, solo se han aislado y caracterizado unas pocas enzimas del fitoplancton marino. La investigación ha demostrado la presencia de haloperoxidasas únicas (por ejemplo, vanadio bromoperoxidasa con un alto grado de estabilidad a desnaturalización térmica y por solvente orgánico) en algas.

Debido a la opinión positiva de los consumidores sobre enzimas, se han hecho esfuerzos para encontrar nuevas áreas de aplicación en productos alimenticios y cosméticos (tal como alimentos funcionales, nutricosméticos, enzimas en protección de la piel). Se pueden usar enzimas con la capacidad de capturar radicales libres y prevenir de esta manera el daño a la piel causado por la contaminación medioambiental, bacterias, humo, luz solar y otros factores dañinos. En este caso, la enzima más protectora y prometedora es superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1).

SOD es una enzima que cataliza la dismutación de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno y contribuye al importante mecanismo de defensa antioxidante en células cercanas expuestas a oxígeno. SOD se usa en productos cosméticos para reducir el daño de radicales libres a la piel. Esta enzima también está presente actualmente en ensayos clínicos para enfermedades que implican estrés oxidativo y muestra potente actividad antiinflamatoria. La SOD de hígado bovino incluso tuvo autorización reglamentaria en varios países europeos para tal uso. Sin embargo, se truncó, aparentemente, por preocupaciones sobre la enfermedad de priones. Se ha propuesto usar una combinación de SOD y peroxidasa como captadores de radicales libres en productos cosméticos debido a su capacidad de reducir eritema inducido por UV cuando se aplican por vía tópica.

Se ha divulgado la producción y purificación de enzimas y extractos que contienen las mismas de microalgas, así como sus aplicaciones. A modo de ilustración, el documento ES223450T3 divulga un método para obtener un extracto termoestable de un medio de cultivo de microalgas que tiene actividad antioxidante y de curación de cicatrices. El método comprende una primera etapa de cultivar dichas microalgas en condiciones apropiadas de luz, temperatura, pH y CO_2 y una segunda etapa de someter dicho cultivo a supersaturación de oxígeno. El documento US5179012A enseña un proceso para producir un extracto rico en antioxidantes a partir de un cultivo de microalgas, en donde las microalgas se cultivan en un fotobiorreactor cerrado y el oxígeno producido por la fotosíntesis por las microalgas se recoge y reinyecta en el medio de cultivo. El documento US2009130139 divulga un ingrediente cosmético activo que comprende un extracto de microalgas y ferrulato de arginina. Okamoto y col. (Okamoto, OK *et al.*, Journal of Phycology 1996, 32: 74-79) enseña el efecto del metal pesado cadmio en el crecimiento y producción de SOD de *Tetraselmis gracilis*. Maligan y col. (Maligan et al., 10/2011; In proceedings of: 5th Young Scientist Seminar) describe la actividad antioxidante y antibacteriana de un extracto de *Tetraselmis chuii*. Misra & Fridovich (Misra, HP y Fridovich I, Journal of Biological Chemistry 1997, 252: 6421-6423) describen un método para la purificación de superóxido dismutasa del alga roja *Porphyridium cruentum*. Boland y col. (Boland MJ et al., Journal of Biotechnology 1991, 19: 19-33) describe la purificación de diferentes enzimas, incluyendo SOD, de tejidos animales usando sistemas de dos fases acuosas. Ulloa y col. (Ulloa G et al., Green Chemistry 2012, 14: 1044-1051) describe un sistema de reparto de dos fases acuosas tensioactivo/sal para la extracción de antioxidantes de la microalga *Tetraselmis suecica*.

C-C Chung et al., Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69 (2): 754-59 desvela un método de cultivo de *T. chuii* en condiciones de ausencia de fosfato o nitrógeno, específicamente una concentración de fosfato de 0,363 µM y una concentración de nitrato de 8,83 µM.

Medeiros et al., Iheringia/Série Botânica 1997, 48: 3-14 desvela un método de cultivo de *T.chuii* en condiciones de alta salinidad, específicamente, con una salinidad de 15, 20, 25 y 30 PSU.

Nellis et al., Acta Científica Venozolanan 1994, 45 (3): 226-30 desvela un método de cultivo de *T. chuii* en condiciones de alta salinidad, específicamente cultivado en tanques externos de agua de mar enriquecida al 30 y 37 ‰ con fertilizantes naturales.

Dickson D. M. et al., New Phytologist 1987, 106 (4): 657-66 desvela un método de cultivo de *T. chuii* en condiciones de alta salinidad, específicamente, con salinidades en equilibrio de 150 a 700 mol m^{-3} NaCl.

F. Ghezelbash et al., Research Journal of Biological Sciences, 2008, 3(3):311-314, desvela el crecimiento / la producción de biomasa de *T. Chuii* en un medio con una salinidad de 50 PSU.

Chen S.Y. et al., Botanical Studies, 2012, 53:125-133 desvela un crecimiento / una producción de una biomasa de *T. Chuii* a 30 ºC.

Aunque la producción y purificación de enzimas y extractos que contienen las mismas de microalgas se conoce, la actividad SOD recuperada en métodos del estado de la técnica es, generalmente, baja. Por tanto, existe la necesidad de proporcionar métodos que permitan la producción y purificación de enzimas, particularmente actividad SOD, en cantidades mayores y con mayor rendimiento.

Sumario de la invención

Se ha estudiado la producción de SOD en diferentes especies de microalgas en diferentes sistemas de cultivo. Para ese fin, se ensayaron un total de 11 cepas de microalgas en diferentes condiciones de estrés abiótico en diferentes sistemas de cultivo incluyendo cultivos interiores y exteriores para ver cómo estos afectan la actividad SOD de las diferentes cepas. Se encontró que *Tetraselmis chuii* tenía la mayor actividad SOD en todas las condiciones abióticas probadas, aunque la mayor actividad se obtuvo con ausencia de nitrógeno (ejemplo 1).

Además, se desarrollaron diferentes sistemas bifásicos acuosos PEG-fosfato, como una estrategia de extracción económica para el fraccionamiento y purificación parcial de la actividad SOD de extractos sin células de *T. chuii*. Se llevó a cabo un estudio detallado para analizar el efecto de la masa molar de PEG, concentración, pH y composición iónica en el sistema sobre el comportamiento de reparto de la actividad superóxido dismutasa en la fase rica en fosfato. Se seleccionaron dos sistemas de dos fases acuosas de polietilenglicol/fosfato (PEG/Pi) compuestos de: PEG 1500: PEG al 12% p/p, Pi al 20% p/p suplementado con NaCl al 10% p/p, y PEG 3000: PEG al 12% p/p, Pi al 20% p/p suplementado con NaCl al 3,5% p/p, como los sistemas con la mayor selectividad de SOD sobre proteínas totales de microalgas nativas (ejemplo 2). En estas condiciones, se alcanzó suficiente purificación (2-4 veces) con alta recuperación (>80%) para SOD en la fase fosfato inferior. Además, el sistema permite la eliminación de compuestos de bajo peso molecular no deseados, tal como clorofilas y polifenoles. La fase SOD/fosfato muestra alta termoestabilidad a 50ºC y 60ºC.

Además, ensayos de toxicidad *in vitro*, demostraron que el extracto sin células de *T. chuii* podría proteger eficazmente fibroblastos de piel primarios humanos contra el daño oxidativo causado por H_2O_2 (ejemplo 3).

Por tanto, en un primer aspecto, la invención se refiere a un método para obtener una biomasa de una microalga de la especie *T. chuii* enriquecida en SOD que comprende cultivar dicha microalga con estrés abiótico, en donde dicho estrés abiótico se selecciona del grupo que consiste en un potencial redox de al menos 200 mV en el medio de cultivo, y una concentración de nitrato en el medio de cultivo de menos de 1 µM.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un método para enriquecer superóxido dismutasa (SOD) en una biomasa de la especie *Tetraselmis chuii* que comprende cultivar dicha microalga con estrés abiótico, en donde dicho estrés abiótico se selecciona del grupo que consiste en un potencial redox de al menos 200 mV en el medio de cultivo, y una concentración de nitrato en el medio de cultivo de menos de 1 µM.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a una biomasa de una microalga de la especie *T. chuii* enriquecida en SOD obtenida por el método del primer aspecto o una biomasa de una microalga de la especie *T. chuii* enriquecida en SOD por el método del segundo aspecto.

En un cuarto aspecto, la invención se refiere a un método para obtener un extracto de proteína enriquecido en SOD de dicha biomasa de una microalga de la especie *T. chuii*, que comprende las etapas de

(i) homogenizar dicha biomasa de la especie *T. chuii* obteniendo de esta manera un homogenizado, y
(ii) fraccionar el homogenizado obtenido en la etapa (i) por un sistema de partición bifásico acuoso de polietilenglicol (PEG)/fosfato, obteniéndose de esta manera un extracto de proteína enriquecido en SOD en la fracción acuosa de fosfato, en donde el sistema de partición bifásico acuoso de polietilenglicol/fosfato (PEG/Pi) se selecciona de los sistemas compuestos de:

- 12% en p/p de polietilenglicol que tiene un peso molecular promedio de 1500 Da y 20% de fosfato,

suplementado con el 10% en p/p de NaCl y

- 12% p/p de polietilenglicol que tiene un peso molecular promedio de 3000 Da y el 20% en p/p de fosfato suplementado con el 3,5% en p/p de NaCl.

En otro aspecto, la invención se refiere a un extracto de proteína enriquecido en SOD obtenido por dicho método de obtención de un extracto proteico enriquecido en SOD.

En otro aspecto, la invención se refiere a un producto alimenticio que comprende dicha biomasa de una microalga de la especie *T. chuii* enriquecida en SOD del tercer aspecto, o la biomasa del tercer aspecto que está deshidratada o tratada con salmuera, o dicho extracto de proteína enriquecido en SOD.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende dicha biomasa de una microalga de la especie *T. chuii* enriquecida en SOD del tercer aspecto, o la biomasa del tercer aspecto que está deshidratada o tratada con salmuera, o dicho extracto de proteína enriquecido en SOD.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de dicha biomasa de una microalga de la especie *T. chuii* enriquecida en SOD del tercer aspecto, o de la biomasa del tercer aspecto que está deshidratada o tratada con salmuera, o de dicho extracto de proteína enriquecido en SOD como un cosmético.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de dicha biomasa de una microalga de la especie *T. chuii* enriquecida en SOD del tercer aspecto, o de la biomasa del tercer aspecto que está deshidratada o tratada con salmuera, o de dicho extracto de proteína enriquecido en SOD como un antioxidante.

En otro aspecto, la invención se refiere a dicha biomasa de una microalga de la especie *T. chuii* enriquecida en SOD del tercer aspecto, o de la biomasa del tercer aspecto que está deshidratada o tratada con salmuera, o de dicho extracto de proteína enriquecido en SOD para su uso en medicina.

En otro aspecto, la invención se refiere a dicha biomasa de una microalga de la especie *T. chuii* enriquecida en SOD del tercer aspecto, o de la biomasa del tercer aspecto que está deshidratada o tratada con salmuera, o dicho extracto de proteína enriquecido en SOD, o de dicha composición farmacéutica para su uso en la prevención y/o tratamiento de un enfermedad o afección caracterizada por un estrés oxidativo y/o actividad inflamatoria, o en mejorar la tolerancia a radioterapia.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de una salmuera que comprende entre 10 y 18 g/l de azufre total (S), entre 40 y 55 g/l de sulfato (SO_4^{2-}), entre 60 y 1.500 mg/l de calcio (Ca^{2+}), entre 52 y 70 g/l de magnesio (Mg^{2+}), entre 15 y 20 g/l de potasio (K^+), entre 9 y 20 g/l de potasio (Na^+), entre 115 y 180 g/l de cloruro (Cl^-) y que tiene una densidad entre 1,25 y 1,30 g/ml a 20ºC como un estabilizador de SOD comprendida en una biomasa de una microalga que contiene SOD, en donde dicha biomasa es la biomasa de una microalga de la especie *T. chuii* enriquecida en SOD de acuerdo con el tercer aspecto.

En otro aspecto, la invención se refiere a una biomasa de una microalga de la especie *T. chuii* enriquecida en SOD caracterizada en que SOD se estabiliza con una salmuera, en donde la salmuera comprende entre 10 y 18 g/l de azufre total (S), entre 40 y 55 g/l de sulfato (SO_4^{2-}), entre 60 y 1.500 mg/l de calcio (Ca^{2+}), y entre 52 y 70 g/l de magnesio (Mg^{2+}), y entre 15 y 20 g/l de potasio (K^+), y entre 9 y 20 g/l de potasio (Na^+), y entre 115 y 180 g/l de cloruro (Cl^-) y que tiene una densidad entre 1,25 y 1,30 g/ml a 20ºC, en donde dicha biomasa es la biomasa de una microalga de la especie *T. chuii* enriquecida en SOD de acuerdo con el tercer aspecto.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 es un diagrama de barras que muestra la actividad SOD para las diferentes cepas probadas en los diferentes tratamientos como se describe en la tabla 1 (ejemplo 1).

La figura 2 muestra el flujo de trabajo del proceso de optimización de ATPS.

La figura 3 es un diagrama de barras que muestra el efecto de diferentes condiciones (tabla 1) sobre la purificación de SOD (purificación en veces) usando un ATPS compuesto de PEG 1500.

La figura 4 es un diagrama de barras que muestra el efecto de diferentes condiciones (tabla 1) sobre la purificación de SOD (purificación en veces) usando un ATPS compuesto de PEG 3000.

La figura 5 es una foto que muestra la separación de fases final de las condiciones seleccionadas después del cribado inicial PEG/Pi (ejemplo 2), en donde se representan la fase PEG superior, la interfase con los restos celulares y la fase inferior de Pi.

La figura 6 es un diagrama de barras que muestra la purificación en veces de las diferentes condiciones de pH/NaCl investigadas (PEG 1500).

La figura 7 es un diagrama de barras que muestra la purificación en veces de las diferentes condiciones de pH/NaCl investigadas (PEG 3000).

La figura 8 es un diagrama de barras que muestra la purificación en veces de las diferentes condiciones de pH/NaCl investigadas (PEG 6000 (10)).

La figura 9 es un diagrama de barras que muestra las purificaciones en veces y rendimiento de las condiciones seleccionadas de aumento a escala (PEG 1500).

La figura 10 es un diagrama de barras que muestra la purificación en veces y rendimiento de las condiciones seleccionadas de aumento a escala (PEG 3000).

La figura 11 es un diagrama de barras que muestra la purificación en veces y rendimiento de las condiciones seleccionadas de aumento a escala (PEG 6000 (10)).

La figura 12 es una foto que muestra el ATPS aumentado a escala de PEG 1500 (10 g).

La figura 13 es una foto que muestra el ATPS aumentado a escala de PEG 3000 (10 g).

La figura 14 es una foto que muestra el ATPS aumentado a escala de PEG 6000 (10) (10 g).

La figura 15 es un diagrama de barras que muestra los valores de Purificación-Veces (A) y Purificación-Rendimiento (B) para PEG 1500 y PEG 3000 obtenidos de tres experimentos independientes. Se muestra el valor medio ± desviación estándar en la tabla 5 (ejemplo 2).

La figura 16 es un diagrama de barras que muestra el rendimiento de un experimento de aumento a escala de ATPS (100 g).

La figura 17 es un gráfico que muestra la actividad SOD específica (%) como función del tiempo del extracto crudo después de tratamiento térmico a 40ºC.

La figura 18 es un gráfico que muestra la actividad SOD específica (%) como función del tiempo del extracto crudo después de tratamiento térmico a 50ºC.

La figura 19 es un gráfico que muestra la actividad SOD específica (%) como función del tiempo de la fase Pi de PEG 1500 después de tratamiento térmico a 50ºC.

La figura 20 es un gráfico que muestra la actividad SOD específica (%) como función del tiempo de la fase Pi de PEG 1500 después de tratamiento térmico a 60ºC.

La figura 21 es un gráfico que muestra la actividad SOD específica (%) como función del tiempo de la fase Pi de PEG 3000 después de tratamiento térmico a 50ºC.

La figura 22 es un gráfico que muestra la actividad SOD específica (%) como función del tiempo de la fase Pi de PEG 3000 después de tratamiento térmico a 60ºC.

La figura 23 es una foto que muestra la formación de fases de las condiciones de ATPS optimizadas después de (A) centrifugación de 10 minutos a 1.600xg y (B) 12 h en equilibrio.

La figura 24 es una foto que muestra la formación de fases de las condiciones de ATPS de PEG 1500 optimizadas 12 h en equilibrio a un peso final de aproximadamente 65 g.

La figura 25 es un diagrama de barras que muestra los resultados del ensayo de protección *in vitro* de extracto sin células de *T. chuii* contra la toxicidad celular causada por H_2O_2 en células NHDF cultivadas. Se estimó la viabilidad celular por el contenido de ATP medido como unidades de luciferasa (UL) (ejemplo 3).

Descripción detallada de la invención

Método para obtener una biomasa de una microalga de la especie *Tetraselmis chuii* enriquecida en SOD

En un aspecto, la invención se refiere a un método para obtener una biomasa de una microalga de la especie *Tetraselmis chuii* enriquecida en SOD, de aquí en adelante denominado el "método de producción de la invención", que comprende cultivar dicha microalga con estrés abiótico, en donde dicho estrés abiótico se selecciona del grupo que consiste en un potencial redox de al menos 200 mV en el medio de cultivo, y una concentración de nitrato en el medio de cultivo de menos de 1 µM.

Tetraselmis chuii, o *T. chuii*, es un alga unicelular marina (microalga) que pertenece a la clase Chlorodendrophyceae, orden Chlodendrales, familia Chlorodendraceae; es verde, móvil y habitualmente crece 10 µm de longitud x 14 µm de anchura.

Según el método de producción de la invención, la microalga *T. chuii* se cultiva con estrés abiótico. Antes de aplicar el estrés abiótico, el cultivo de *T. chuii* se realiza en un medio adecuado, tal como, por ejemplo, en medio de cultivo F/2 [Guilard R. R. L. & Ryther, J. H. 1962. "Studies of marine planktonic diatoms. I. Cyclotela nana Hustedt and Detonula confervaceae (Cleve) Gran." Can. J. Microbiol. 8, 229-239], en condiciones de luz solar o iluminación adecuada (intensidad luminosa) y condiciones controladas de pH, temperatura y alimentación de dióxido de carbono (CO_2), como saben bien los expertos en la materia. El medio de cultivo F/2 comprende una fuente de nitrógeno, una fuente de fósforo, oligoelementos tal como, por ejemplo, sodio, hierro, cobre, zinc, cobalto, manganeso y molibdeno, así como una mezcla de vitaminas tal, por ejemplo, cianocobalamina (vitamina B12), tiamina (vitamina B1) y biotina en un medio acuoso.

La intensidad luminosa se regula de modo que se permite la fotosíntesis; por tanto, aunque puede variar en un amplio intervalo, en una forma de realización particular, la intensidad luminosa aplicada al medio de cultivo está comprendida entre 60 y 2000 µmol fotones m^{-2} s^{-1}, en el interior típicamente aproximadamente 150 µmol fotones m^{-2} s^{-1}. El pH puede variar habitualmente entre aproximadamente 7 y aproximadamente 8,5, típicamente aproximadamente 7,5. Se selecciona una temperatura que fomenta el crecimiento de *T. chuii* habitualmente comprendida entre aproximadamente 17ºC y aproximadamente 28ºC, típicamente entre aproximadamente 24ºC y 26ºC. El cultivo se realiza con o sin aeración, típicamente con aeración, por ejemplo, con aproximadamente del 0,5 al 5, preferiblemente aproximadamente 1-2% de CO_2 en aire atmosférico.

Cuando la densidad celular del medio de cultivo es óptima, lo que normalmente se produce durante la fase logarítmica, o de crecimiento exponencial, es decir, aproximadamente de 2 a 7 días después de empezar el cultivo, el estrés abiótico se aplica al medio de cultivo. Para ese fin, las velocidades de crecimiento se pueden seguir por técnicas convencionales, por ejemplo, por recuentos de células por microscopía.

Como se usa en el presente documento, la expresión "estrés abiótico" se refiere al impacto negativo de factores no vivos sobre los organismos vivos en un medio específico. La variable no viva debe influir el entorno más allá de su intervalo normal de variación para afectar adversamente al rendimiento de la población o fisiología individual del organismo de una manera significativa.

Hay muchos factores de estrés abiótico que pueden afectar el crecimiento de microalgas, por ejemplo, *T. chuii*, y la producción de compuestos y metabolitos de los mismos; no obstante, en el método de producción de la invención, el estrés abiótico se selecciona del grupo que consiste en un potencial redox de al menos 200 mV en el medio de cultivo y una concentración de nitrato en el medio de cultivo de menos de 1 µM.

Según la invención, un estrés abiótico basado en un potencial redox de al menos 200 mV en el medio de cultivo comprende mantener el medio de cultivo con un potencial redox de al menos 200 mV, al menos 300 mV, al menos 400 mV, al menos 500 mV, al menos 600 mV, al menos 700 mV, al menos 800 mV, al menos 900 mV, al menos 1000 mV; dicho estrés abiótico se puede obtener por métodos convencionales para obtener condiciones de alto potencial redox en medios de cultivo, tal como, por ejemplo, por la adición de ozono que normalmente se genera usando un generador de ozono mediante reacción del aire con UV. La cantidad de ozono que se va a añadir es la necesaria para alcanzar y mantener el medio de cultivo con un potencial redox de al menos 200 mV, al menos 300 mV, al menos 400 mV, al menos 500 mV, al menos 600 mV, al menos 700 mV, al menos 800 mV, al menos 900 mV, al menos 1000 mV.

Un estrés abiótico basado en una temperatura mayor de 28ºC, según la divulgación, comprende mantener el medio de cultivo a una temperatura de al menos 28ºC, al menos 30ºC, al menos 35ºC, al menos 40ºC, al menos 45ºC, al menos 50ºC; dicha temperatura en el medio de cultivo se puede obtener por métodos convencionales. Puesto que el cultivo puede ser interior o exterior, para cultivos interiores, la temperatura de la sala de cultivo se debe ajustar por encima de 28ºC; mientras que para cultivos exteriores, el cultivo se debe hacer en localizaciones apropiadas en donde dicha temperatura se alcanza de forma natural por la temperatura medioambiental, por ejemplo durante la primavera y el verano en el sur de España, por ejemplo, Cádiz, Málaga, Sevilla, etc.

Tal como se desvela en el presente documento, un estrés abiótico basado en una salinidad mayor de 35 en el medio de cultivo comprende mantener el medio de cultivo con una salinidad de al menos 35 PSU (unidades de salinidad práctica), al menos 40 PSU, al menos 45 PSU, al menos 50 PSU, al menos 100, al menos 200, al menos 300. En una divulgación particular, la salinidad en el medio de cultivo es mayor de 45 PSU. El experto en la materia sabe cómo determinar la salinidad del medio de cultivo usando técnicas estándar (UNESCO, 1981, "Background papers and supporting data on the practical salinity scale 1978" Unesco Technical papers in marine science, 37). Un estrés abiótico basado en condición de alta salinidad se puede obtener fácilmente añadiendo sal a dicho medio de cultivo hasta que se alcanza la condición de salinidad, por ejemplo, evaporando agua de mar natural hasta que se alcanza la salinidad diana o añadiendo sales marinas comercialmente disponibles.

Un estrés abiótico basado en la ausencia de nitrógeno, según la divulgación, comprende hacer crecer *T. chuii* en condiciones de deficiencia, limitación o privación de nitrógeno; dicho estrés abiótico se puede alcanzar fácilmente parando el suministro de nitrógeno al medio de cultivo (es decir, absteniéndose de añadir nitrógeno al medio de cultivo).

En un aspecto particular del método de producción desvelado, el estrés abiótico comprende la ausencia de nitrógeno. El término "ausencia de nitrógeno", como se usa en el presente documento, se refiere a una condición en la que el suministro de nitrógeno es tal que la concentración de nitrato en el medio de cultivo es menor de 200 µM, menor de 100 µM, menor de 10 µM, menor de 5 µM, menor de 1 µM, menor de 0,1 µM, menor de 0,001 µM o una condición en la que el suministro de nitrógeno es tal que la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo es menor de 10 µg/ml, menor de 5 µg/ml, menor de 3 µg/ml, menor de 1 µg/ml, menor de 0,1 µg/ml, menor de 0,08 µg/ml, menor de 0,05 µg/ml, menor de 0,001 µg/ml. Según la invención, la ausencia de nitrógeno significa una concentración de nitrato en el medio de cultivo de menos de 1 µM. En una divulgación particular, la ausencia de nitrógeno significa una concentración de nitrógeno en el medio de cultivo de menos de 10 µg/ml. En otro aspecto particular, cuando la única fuente de nitrógeno es nitrato, la ausencia de nitrógeno significa una concentración de nitrato en el medio de cultivo de menos de 1 µM.

El cultivo de *T. chuii* se puede operar en modo continuo, semicontinuo, por lotes o por lotes alimentados. En una forma de realización particular, el cultivo de *T. chuii* se opera en modo por lotes alimentados para prevenir limitación de nutrientes.

Los cultivos de *T. chuii* se pueden realizar en el interior o exterior. Los cultivos exteriores se pueden realizar en sistemas abiertos o cerrados.

Los sistemas abiertos incluyen estanques con canales de recirculación que tienen aproximadamente de 20 a 35 cm de profundidad para asegurar la exposición adecuada a la luz solar. Ruedas de palas proporcionan la fuerza motriz y mantienen las microalgas suspendidas en el agua. A los estanques se les suministra agua y nutrientes.

Los sistemas cerrados incluyen fotobiorreactores (FBR) tubulares que habitualmente consisten en una bomba que dirige el medio de cultivo a través de un receptor solar tubular horizontal. Un FBR proporciona un medio controlado y permite alta productividad de microalgas. Como es un sistema cerrado, todos los requisitos de crecimiento de microalgas se introducen en el sistema y controlan según los requisitos. Los FBR facilitan mejor control del medio ambiente del cultivo tal como suministro de dióxido de carbono, suministro de agua, temperatura óptima, exposición eficaz a la luz, densidad del cultivo, niveles de pH, velocidad de suministro de gas, pauta de mezcla, etc.

Según el método de producción de la invención, una vez que se ha cultivado *T. chuii* con estrés abiótico, se produce una biomasa de la microalga *T. chuii* enriquecida en SOD.

El término "biomasa", como se usa en el presente documento, incluye material biológico que comprende organismos vivos, o recientemente vivos. Por extensión, el término incluye no solo el material biológico o la materia orgánica que constituye un organismo, sino también el material biológico o materia orgánica generados en un proceso biológico, espontáneo o no espontáneo (es decir, provocado).

La expresión "biomasa de una microalga de la especie *T. chuii* enriquecida en SOD" se refiere a una biomasa de *T. chuii* que tiene una actividad SOD mayor que la correspondiente a una biomasa de *T. chuii* de referencia. Puesto que *T. chuii* produce SOD cuando se cultiva en condiciones estándar, una "biomasa de *T. chuii* de referencia" es una biomasa obtenida cultivando *T. chuii* en condiciones estándar, es decir cultivando *T. chuii* en medio de cultivo F/2 a 150 µmol fotones m^{-2} s^{-1}, a una temperatura entre 24ºC y 26ºC, a pH 7,5, y con aire atmosférico enriquecido con CO_2 al 1-2%. En estas condiciones, un cultivo de *T. chuii* proporciona una biomasa que muestra una actividad SOD de aproximadamente 180 UI/mg de proteína soluble cuando se determina siguiendo la inhibición de la velocidad de reducción de citocromo *c* en un sistema acoplado, usando xantina y xantina oxidasa a Pi 216 mM, pH 7,8, 25ºC, como se describe en el ejemplo 1. Por tanto, una biomasa de una microalga de la especie *T. chuii* enriquecida en SOD normalmente muestra una actividad SOD igual a o mayor de 180 UI/mg de proteína soluble, habitualmente igual a o mayor de 200 UI/mg de proteína soluble, típicamente igual a o mayor de 250 UI/mg de proteína soluble, cuando la actividad SOD se ensaya según el método mencionado anteriormente. En una forma de realización, la biomasa de una microalga de la especie *T. chuii* está enriquecida en SOD cuando la actividad SOD es al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 100%, al menos el 200%, al menos el 300%, al menos el 400%, al menos el 500%, al menos el 600%, al menos el 700%, al menos el 800%, al menos el 900%, al menos el 1000% o más con respecto a la actividad SOD en una biomasa de referencia como se ha definido anteriormente.

Una vez que se ha cultivado *T. chuii* en condiciones de estrés abiótico según el método de producción de la invención, la biomasa resultante de *T. chuii* enriquecida en SOD se recoge del cultivo y se estabiliza. La biomasa de *T. chuii* enriquecida en SOD así producida se puede recoger por métodos convencionales que conoce el experto en la materia, tal como, por ejemplo, por filtración o centrifugación; a continuación, la biomasa recogida preferible y ventajosamente se lava para eliminar material no biológico (por ejemplo, precipitados de sales minerales y similares). Posteriormente, la biomasa se estabiliza bien por deshidratación o añadiendo dicha biomasa a una solución de salmuera rica en

magnesio. El término “deshidratación” se refiere a la eliminación parcial y/o completa del agua de la biomasa. Por ejemplo, la cantidad de agua eliminada de la biomasa puede ser de al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 99% o el 100% del agua originalmente contenida en la biomasa. La deshidratación de la biomasa se puede realizar por cualquier método adecuado, por ejemplo, por liofilización o secado por rociado.

En una forma de realización particular, la deshidratación se realiza por liofilización. El término “liofilización” como se usa en el presente documento, se refiere a la eliminación de agua por la técnica de sublimación y eliminación de vapor de agua al vacío; es decir, el paso directo del agua congelada del estado sólido al estado vapor y la posterior eliminación del vapor.

En otra forma de realización particular, la deshidratación se realiza por secado por rociado. El término “secado por rociado” se refiere a un método de deshidratación que comprende romper mezclas líquidas en pequeñas gotitas (atomización) y eliminar rápidamente el solvente de la mezcla en un recipiente (aparato de secado por rociado) donde hay una fuerza impulsora fuerte para la evaporación del solvente de las gotitas. El secado por rociado de la biomasa se puede realizar, por ejemplo, usando un secador BUCHI Mini Spray B-29, inyectando con la bomba a una velocidad del 40% una solución del producto del 10% en peso seco, el ajuste de temperatura de entrada a 130ºC, la temperatura de salida cayendo por debajo de 60ºC y el ajuste del aspirador a velocidad del 100%.

En una forma de realización particular, la biomasa se estabiliza añadiendo dicha biomasa a una solución de salmuera rica en magnesio. Dicha solución de salmuera rica en magnesio comprende entre 10 y 18 g/l de azufre total (S), entre 40 y 55 g/l de sulfato (SO_4^{2-}), entre 60 y 1.500 mg/l de calcio (Ca^{2+}), entre 52 y 70 g/l de magnesio (Mg^{2+}), entre 15 y 20 g/l de potasio (K^+), entre 9 y 20 g/l de potasio (Na^+); entre 115 y 180 g/l de cloruro (Cl^-), y tiene una densidad entre 1,25 y 1,30 g/ml a 20ºC. Dicha solución de salmuera rica en magnesio, cuyos particulares se discutirán posteriormente, se puede usar por tanto como un estabilizador de SOD comprendida en una biomasa de una microalga que contiene SOD.

Una vez la masa de microalgas se ha estabilizado, la actividad SOD de la biomasa se puede determinar. Aunque se pueden seguir diferentes métodos y kits para la determinación de la actividad SOD, en una forma de realización particular, la actividad SOD de la biomasa se determina siguiendo la inhibición de la velocidad de reducción de citocromo *c* en un sistema acoplado, usando xantina y xantina oxidasa a Pi 216 mM, pH 7,8, 25ºC, como se describe en el ejemplo 1.

Según el método de producción de la invención, se obtiene una biomasa de *T. chuii* enriquecida en SOD que muestra una actividad SOD mayor de 180 UI/mg de proteína soluble cuando se determina siguiendo la inhibición de la velocidad de reducción de citocromo *c* en un sistema acoplado, usando xantina y xantina oxidasa a Pi 216 mM, pH 7,8, 25ºC, como se describe en el ejemplo 1, dependiendo del estrés abiótico usado; por tanto, como se muestra en la figura 1, de media:

- cuando se cultiva *T. chuii* en condiciones de ausencia de nitrógeno, se obtiene una biomasa de *T. chuii* enriquecida en SOD que muestra una actividad SOD comprendida entre aproximadamente 700 y aproximadamente 730 UI/mg de proteína soluble;
- cuando se cultiva *T. chuii* en condiciones de alta temperatura, se obtiene una biomasa de *T. chuii* enriquecida en SOD que muestra una actividad SOD comprendida entre aproximadamente 487,50 y 512,5 UI/mg de proteína soluble;
- cuando se cultiva *T. chuii* en condiciones de alta salinidad, se obtiene una biomasa de *T. chuii* enriquecida en SOD que muestra una actividad SOD comprendida entre aproximadamente 391,10 y 428,9 UI/mg de proteína soluble; y
- cuando se cultiva *T. chuii* en condiciones de alto potencial redox, se obtiene una biomasa de *T. chuii* enriquecida en SOD que muestra una actividad SOD comprendida entre aproximadamente 454,7 y 465,3 UI/mg de proteína soluble.

Método para enriquecer una biomasa de *T. chuii* en SOD

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para enriquecer una biomasa de una microalga de la especie *Tetraselmis chuii* en superóxido dismutasa (SOD), de aquí en adelante “método de enriquecimiento de la invención”, que comprende cultivar dicha microalga en estrés abiótico, en donde dicho estrés abiótico se selecciona del grupo que consiste en un potencial redox de al menos 200 mV en el medio de cultivo, y una concentración de nitrato en el medio de cultivo de menos de 1 µM.

Los términos “biomasa de una microalga de la especie *T. chuii*” y “SOD”, así como las condiciones de cultivo para *T. chuii* antes de aplicar el estrés abiótico se han definido previamente en relación con el método de producción de la invención.

El término “estrés abiótico” se refiere al impacto negativo de factores no vivos sobre los organismos vivos en un medio ambiente específico. La variable no viable debe influir el medio ambiente más allá de su intervalo normal de variación

para afectar adversamente el rendimiento de población o fisiología individual del organismo de un modo significativo. En una divulgación particular, el estrés abiótico se selecciona del grupo que consiste en alto potencial redox, alta temperatura, alta salinidad y ausencia de nitrógeno.

Según la invención, un estrés abiótico basado en un alto potencial redox comprende mantener el medio de cultivo con un potencial redox de al menos 200 mV, al menos 300 mV, al menos 400 mV, al menos 500 mV, al menos 600 mV, al menos 700 mV, al menos 800 mV, al menos 900 mV, al menos 1000 mV. Los métodos para obtener dicho estrés abiótico se han definido previamente.

Un estrés abiótico basado en alta temperatura comprende mantener el medio de cultivo a una temperatura de al menos 28ºC, al menos 30ºC, al menos 35ºC, al menos 40ºC, al menos 45ºC, al menos 50ºC. Los métodos para obtener dicha alta temperatura se han definido previamente.

Según la invención, un estrés abiótico basado en una condición de alta salinidad comprende mantener el medio de cultivo con una salinidad de al menos 35 PSU (unidades de salinidad práctica), al menos 41 PSU, al menos 45 PSU, al menos 50 PSU, al menos 50 PSU, al menos 100, al menos 200, al menos 300. En una divulgación particular, la salinidad en el medio de cultivo es mayor de 41 PSU. Los métodos para obtener dicha alta salinidad se han definido previamente.

Un estrés abiótico basado en la ausencia de nitrógeno se ha definido previamente en relación con el método de producción de la invención.

Biomasa de *T. chuii* enriquecida en SOD

En otro aspecto, la invención se refiere a una biomasa de una microalga de la especie *T. chuii* enriquecida en SOD, de aquí en adelante denominada la "biomasa de *T. chuii* enriquecida en SOD de la invención", obtenida por el método de producción de la invención o enriquecida en SOD por el método de enriquecimiento de la invención.

Como se ha mencionado anteriormente, la biomasa de *T. chuii* enriquecida en SOD de la invención muestra una actividad SOD mayor de 180 UI/mg de proteína soluble, normalmente igual a o mayor de 200, típicamente igual a o mayor de 250, habitualmente igual a o mayor de 300, preferiblemente igual a o mayor de 350, más preferiblemente igual a o mayor de 400, aún más preferiblemente igual a o mayor de 450, incluso aún más preferiblemente igual a o mayor de 500, tal como igual a o mayor de 550, igual a o mayor de 600, igual a o mayor de 650, igual a o mayor de 700 UI/mg de proteína soluble, cuando se determina siguiendo la inhibición de la velocidad de reducción de citocromo *c* en un sistema acoplado, usando xantina y xantina oxidasa a Pi 216 mM, pH 7,8, 25ºC, como se describe en el ejemplo 1.

En una forma de realización particular, la biomasa de *T. chuii* enriquecida en SOD obtenida por el método de producción de la invención se obtiene cultivando *T. chuii* en condiciones de una concentración de nitrato en el medio de cultivo de menos de 1 µM. En una divulgación particular, la biomasa de *T. chuii* enriquecida en SOD de la invención se obtiene cultivando *T. chuii* en condiciones de ausencia de nitrógeno a una concentración de nitrato en el medio de cultivo de menos de 5 µM, y muestra una actividad SOD comprendida entre aproximadamente 700 y aproximadamente 730 UI/mg de proteína soluble.

En otra divulgación particular, la biomasa de *T. chuii* enriquecida en SOD obtenida por el método de producción desvelado en el presente coumento se obtiene cultivando *T. chuii* en condiciones de temperatura mayor de 28ºC. En una divulgación más particular, la biomasa de *T. chuii* enriquecida en SOD desvelada en el presente documento se obtiene cultivando *T. chuii* en condiciones de temperatura mayor de 28ºC y muestra una actividad SOD comprendida entre aproximadamente 487,50 y 500,5 UI/mg de proteína soluble.

En otra divulgación particular, la biomasa de *T. chuii* enriquecida en SOD obtenida por el método de producción desvelado en el presente documento se obtiene cultivando *T. chuii* en condiciones de salinidad mayor de 45 en el medio de cultivo. En una divulgación más particular, la biomasa de *T. chuii* enriquecida en SOD desvelada en el presente documento se obtiene cultivando *T. chuii* en condiciones de salinidad mayor de 45 en el medio de cultivo y muestra una actividad SOD comprendida entre aproximadamente 391,10 y 428,9 UI/mg de proteína soluble.

En otra forma de realización particular, la biomasa de *T. chuii* enriquecida en SOD obtenida por el método de producción de la invención se obtiene cultivando *T. chuii* en condiciones de potencial redox de al menos 200 mV. En una divulgación particular, la biomasa de *T. chuii* enriquecida en SOD desvelada en el presente documento se obtiene cultivando *T. chuii* en condiciones de potencial redox de al menos 100 mV y muestra una actividad SOD comprendida entre aproximadamente 417 y 460 UI/mg de proteína soluble.

En una forma de realización particular, la biomasa de *T. chuii* enriquecida en SOD por el método de enriquecimiento de la invención se obtiene cultivando *T. chuii* en condiciones de una concentración de nitrato en el medio de cultivo de menos de 1 µM. En una divulgación particular, la biomasa de *T. chuii* enriquecida en SOD desvelada en el presente documento se obtiene cultivando *T. chuii* en condiciones de ausencia de nitrógeno, preferiblemente a una

concentración de nitrato en el medio de cultivo de menos de 5 µM, y muestra una actividad SOD comprendida entre aproximadamente 700 y aproximadamente 730 UI/mg de proteína soluble.

En otra divulgación particular, la biomasa de *T. chuii* enriquecida en SOD por el método de enriquecimiento desvelado en el presente documento se obtiene cultivando *T. chuii* en condiciones de alta temperatura. En una divulgación más particular, la biomasa de *T. chuii* enriquecida en SOD desvelada en el presente documento se obtiene cultivando *T. chuii* en condiciones de alta temperatura y muestra una actividad SOD comprendida entre aproximadamente 487,50 y 500,5 UI/mg de proteína soluble.

En otra divulgación particular, la biomasa de *T. chuii* enriquecida en SOD por el método de enriquecimiento desvelado en el presente documento se obtiene cultivando *T. chuii* en condiciones de alta salinidad. En una divulgación más particular, la biomasa de *T. chuii* enriquecida en SOD desvelada en el presente documento se obtiene cultivando *T. chuii* en condiciones de alta salinidad y muestra una actividad SOD comprendida entre aproximadamente 391,10 y 428,9 UI/mg de proteína soluble.

En otra forma de realización particular, la biomasa de *T. chuii* enriquecida en SOD por el método de enriquecimiento de la invención se obtiene cultivando *T. chuii* en condiciones de un alto potencial redox de al menos 200 mV. En una divulgación más particular, la biomasa de *T. chuii* enriquecida en SOD desvelada en el presente documento se obtiene cultivando *T. chuii* en condiciones de alto potencial redox y muestra una actividad SOD comprendida entre aproximadamente 417 y 460 UI/mg de proteína soluble.

La biomasa de *T. chuii* enriquecida en SOD de la invención ejerce un efecto protector contra el daño oxidativo provocado por H_2O_2. Por tanto, se puede usar como un antioxidante, como un agente antiinflamatorio, y similares, en las industrias cosmética o farmacéutica como un ingrediente activo cosmético o como un principio activo farmacéutico; además, la biomasa de *T. chuii* enriquecida en SOD de la invención se puede usar en la fabricación de productos alimenticios que comprenden dicha biomasa.

Biomasa estabilizada de *T. chuii* enriquecida en SOD de la invención

Como se ha mencionado anteriormente, la biomasa de una microalga de la especie *T. chuii* enriquecida en SOD, es decir, la biomasa de *T. chuii* enriquecida en SOD de la invención, se puede estabilizar bien por liofilización o añadiendo dicha biomasa a una solución de salmuera rica en magnesio.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a una biomasa deshidratada o tratada con salmuera de una microalga de la especie *T. chuii* enriquecida en SOD, de aquí en adelante denominada la "biomasa estabilizada de *T. chuii* enriquecida en SOD de la invención".

Los particulares de la biomasa de *T. chuii* enriquecida en SOD de la invención se han mencionado previamente y se incorporan aquí mediante referencia.

En una forma de realización particular, la biomasa de *T. chuii* enriquecida en SOD de la invención se estabiliza por liofilización. El proceso de liofilización se puede llevar a cabo en liofilizadores de tipo línea múltiple o bandeja. Estos tienen una bomba de vacío para reducir la presión a valores por debajo de la presión ambiente y un condensador refrigerado a temperaturas entre -35 y -80ºC. La biomasa se congela y el proceso de liofilización empieza a -35ºC. La temperatura aumenta lentamente, hasta 20-30ºC, durante varios días hasta que toda el agua se elimina de la biomasa.

En otra forma de realización particular, la biomasa de *T. chuii* enriquecida en SOD de la invención se estabiliza añadiendo dicha biomasa a una solución de salmuera rica en magnesio. En una forma de realización particular, dicha solución de salmuera rica en magnesio comprende entre 10 y 18 g/l de azufre total (S), entre 40 y 55 g/l de sulfato (SO_4^{2-}), entre 60 y 1.500 mg/l de calcio (Ca^{2+}), entre 52 y 70 g/l de magnesio (Mg^{2+}), entre 15 y 20 g/l de potasio (K^+), entre 9 y 20 g/l de potasio (Na^+); entre 115 y 180 g/l de cloruro (Cl^-), y tiene una densidad entre 1,25 y 1,30 g/ml a 20ºC.

La biomasa estabilizada de *T. chuii* enriquecida en SOD de la invención se puede usar en los mismos usos y aplicaciones que los previamente mencionados en relación con la biomasa de *T. chuii* enriquecida en SOD de la invención.

Método para obtener un extracto de proteína enriquecido en SOD

Los inventores han desarrollado una estrategia de extracción para el fraccionamiento y purificación parcial de la actividad SOD de biomasa de *T. chuii,* es decir un sistema basado en un sistema de dos fases acuosas (ATPS) de polietilenglicol/fosfato (PEG/Pi). El sistema ATPS tiene la ventaja de que la fracción fosfato que contiene la actividad SOD está prácticamente desprovista de cualquier compuesto de bajo peso molecular, tal como pigmentos (clorofila) y polifenoles, que son indeseados en la preparación de SOD.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un método para obtener un extracto de proteína enriquecido en

SOD de una biomasa de una microalga de la especie *T. chuii* enriquecida en SOD obtenida por el método de producción de la invención, o enriquecida en SOD por el método de enriquecimiento de la invención, de aquí en adelante denominado el "método de obtención de un extracto de proteína enriquecido en SOD de la invención", que comprende las etapas de:

(i) homogenizar dicha biomasa de una microalga de la especie *T. chuii* obteniendo de esta manera un homogenizado, y
(ii) fraccionar el homogenizado obtenido en el paso (i) mediante un sistema de partición bifásico acuoso de polietilenglicol/fosfato, obteniendo de esta manera un extracto de proteína enriquecido en SOD en la fracción acuosa de fosfato, en donde el sistema de partición bifásico acuoso de polietilenglicol/fosfato (PEG/Pi) se selecciona de los sistemas compuestos de:

- 12% en p/p de polietilenglicol que tiene un peso molecular promedio de 1500 Da y 20% de fosfato, suplementado con el 10% en p/p de NaCl y
- 12% en p/p de polietilenglicol que tiene un peso molecular promedio de 3000 Da y el 20% en p/p de fosfato suplementado con el 3,5% en p/p de NaCl.

Como se usa en el contexto del método de obtención de un extracto de proteína enriquecido en SOD de la invención, dicha biomasa de una microalga de la especie *T. chuii* se selecciona del grupo que consiste en la biomasa de una microalga de la especie *T. chuii* enriquecida en SOD (es decir, la biomasa de *T. chuii* enriquecida en SOD de la invención) y la biomasa de una microalga de la especie *T. chuii* enriquecida en SOD deshidratada o tratada con salmuera (es decir, la biomasa estabilizada de *T. chuii* enriquecida en SOD de la invención).

Los particulares de la biomasa de *T. chuii* enriquecida en SOD de la invención, así como los particulares de la biomasa estabilizada de *T. chuii* enriquecida en SOD de la invención se han mencionado previamente y se incorporan en el presente documento mediante referencia.

Según la etapa (i) del método obtención de un extracto de proteína enriquecido en SOD de la la invención, una biomasa de una microalga de la especie *T. chuii* se homogeniza obteniéndose de esta manera un homogenizado. La homogenización de una biomasa de una microalga de la especie *T. chuii* se puede realizar por métodos convencionales, por ejemplo, sonicación, homogenización a alta presión, molido con bolas o, en general, cualquiera que lise mecánicamente las células. En una forma de realización particular, la homogenización de una biomasa de una microalga de la especie *T. chuii* se realiza añadiendo un tampón de extracción a dicha biomasa y lisando las células de microalga. Aunque se pueden usar potencialmente diferentes tampones de extracción, en una forma de realización particular, dicho tampón de extracción tiene un pH de 7,8 y comprende KH_2PO_4 220 mM. Las células de microalga se pueden lisar por métodos convencionales, por ejemplo, por ultrasonidos; en una forma de realización particular, las células se lisan aplicando ultrasonidos durante 2 minutos con intervalos de 10 segundos (4 ciclos de 30 segundos cada uno, amplificación del 20%). La biomasa se elimina después y el sobrenadante se recoge. La eliminación de la biomasa se puede realizar por métodos convencionales, por ejemplo, por centrifugación; en una forma de realización particular, la biomasa se centrifuga a 16.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente y se recoge el sobrenadante.

Según la etapa (ii) del método de obtención de un extracto de proteína enriquecido en SOD de la invención, el homogenizado obtenido en la etapa (i) se fracciona por medio de un sistema de partición bifásico acuoso de polietilenglicol/fosfato (PEG/Pi), algunas veces denominado "ATPS de PEG/Pi", obteniéndose de esta manera un extracto de proteína enriquecido en SOD en la fracción acuosa de fosfato.

Se puede preparar un ATPS de PEG/Pi a partir de una solución madre de PEG al 50% (p/p) y de una solución madre de fosfato de potasio al 40% (p/p), pH 7,0.

La solución madre de PEG se puede preparar disolviendo la cantidad calculada de PEG en agua desionizada. En la presente descripción, el término "polietilenglicol" o "PEG" se entiende que es cualquier polímero hidrofílico soluble en agua que contiene grupos éter unidos por 2 átomos de carbono, opcionalmente grupos alquileno ramificados. La estructura de PEG es (nótese el elemento repetido entre paréntesis):

$$HO – (CH_2\text{-}CH_2\text{-}O)_n – H$$

en donde "n" es el número de monómeros o unidades de OE.

Por tanto, esta definición incluye polietilenglicoles ramificados o no ramificados, y también copolímeros en bloque o aleatorios que incluyen dicho tipo de unidades. El término también incluye derivados de los grupos hidroxilo terminales, que se pueden modificar (uno o ambos extremos) de modo que se introduzcan grupos alcoxi, acrilato, metacrilato, alquilo, amino, fosfato, isotiocianato, sulfhidrilo, mercapto y sulfato. El polietilenglicol puede tener sustituyentes en los grupos alquileno. Si están presentes, estos sustituyentes son preferiblemente grupos alquilo.

El PEG para su uso en el método de obtención de un extracto de proteína enriquecido en SOD de la invención tiene

un peso molecular medio de 1500 o 3000 Da. En una forma de realización preferida, el PEG tiene un peso molecular medio de 3000 Da.

La solución de fosfato de potasio se puede preparar a una proporción de 7:18 monobásico:dibásico disolviendo las cantidades calculadas de fosfato de potasio monobásico anhidro y fosfato de potasio dibásico anhidro en agua desionizada, y ajustando el pH a 7,0 si es necesario usando una base, por ejemplo, NaOH, o un ácido, por ejemplo, HCl.

Puesto que la distribución de una proteína particular en un sistema de reparto de dos fases depende de sus propiedades fisicoquímicas únicas, tal como tamaño, carga de superficie, hidrofobicidad, etc., si se optimiza apropiadamente, por ejemplo, por ajuste cuidadoso de los factores que influyen la distribución de las proteínas, tal como los particulares de los componentes del sistema de reparto de dos fases, fuerza iónica, pH, etc., se pueden salvar muchos de los defectos de la centrifugación y ultrafiltración, comúnmente usadas en las fases iniciales de extracción dando de esta manera un producto final parcialmente purificado y concentrado.

En una forma de realización, una vez el homogenizado obtenido en la etapa (i) se ha extraído usando el ATPS, la fase que contiene el extracto de proteína enriquecido en SOD en la fracción acuosa de fosfato se tiene que separar de la fase que contiene el PEG. En una forma de realización, las fases se separan usando centrifugación. En otra forma de realización, las dos fases (PEG y Pi), así como la interfase entre ellas, se dejan formar sin centrifugación. Esto facilitaría la purificación a gran escala y disminuiría el coste del proceso.

Por tanto, considerando que los parámetros del ATPS de PEG/Pi, tal como el peso molecular medio del PEG, concentración, composición de sal y pH en el ATPS de PEG/Pi, tienen un gran impacto en la distribución de proteínas (Kp, coeficiente de reparto), es decir, comportamiento de reparto de la actividad SOD en la fase Pi, y el rendimiento total, se diseñó un experimento factorial y se cribaron varias concentraciones diferentes (ejemplo 2). Esas condiciones que produjeron la formación de fases de PEG y Pi distintas y separadas se analizaron para actividad SOD en la fase Pi después de la adición al homogenizado de *T. chuii* obtenido en la etapa (i) para generar un sistema bifásico (ATPS de PEG/Pi). Las mejores condiciones con respecto a la purificación en veces de SOD en la fase Pi se seleccionaron para mejoras adicionales.

Por tanto, inicialmente, se ensayaron diferentes ATPS de PEG/Pi que contenían PEG de diferentes pesos moleculares medios y diferentes proporciones PEG/Pi. Para ese fin, se probaron PEG que tenían diferentes pesos moleculares medios (1500, 3000 y 6000 Da) e intervalos de PEG y Pi entre el 11% y el 20% (p/p) en presencia del homogenizado de *T. chuii* obtenido en la etapa (i) para generar diferentes sistemas bifásicos (ATPS de PEG/Pi) y las fases Pi se analizaron para la actividad SOD. Posteriormente, las mejores condiciones con respecto a la purificación en veces de SOD en la fase Pi se seleccionaron y se realizaron pruebas adicionales generando ATPS de PEG/Pi adicionales usando diferentes valores de pH (6,5, 7, 7,5, 8 y 8,5) y diferentes concentraciones de NaCl (0% p/p, 3,5% p/p, 7% p/p, y 10% p/p). Después de la adición al homogenizado de *T. chuii* obtenido en la etapa (i) se determinó la actividad SOD en la fase Pi. En todos los casos, los diferentes ATPS de PEG/Pi se prepararon mezclando los componentes, preferiblemente suavemente a una temperatura comprendida entre 22ºC y 25ºC; si es necesario, se puede realizar una centrifugación a baja velocidad para alcanzar una separación de fases completa.

Como se muestra en el ejemplo 2, dos sistemas de dos fases acuosas de PEG/Pi compuestos de:

PEG 1500: PEG al 12% p/p, Pi al 20% p/p suplementado con NaCl al 10% p/p, y
PEG 3000: PEG al 12% p/p, Pi al 20% p/p suplementado con NaCl al 3,5% p/p,

se seleccionaron como los sistemas con la mayor selectividad de SOD sobre proteínas totales de microalgas nativas. En estas condiciones, se logró suficiente purificación (2-4 veces) con alta recuperación (>80%) para la actividad SOD en la fase fosfato (Pi) inferior. Además, esos sistemas permiten la eliminación de compuestos de bajo peso molecular indeseados, tal como clorofilas y polifenoles. La fase SOD/fosfato muestra alta termoestabilidad a 50ºC y 60ºC.

Las diferentes fases (PEG y Pi) se pueden separar pipeteando las fases superior (PEG) e inferior (Pi) cuidadosamente para evitar contaminación cruzada.

Por tanto, según la invención, la fase PEG o el sistema bifásico acuoso de PEG/Pi comprende PEG de un peso molecular medio comprendido entre aproximadamente 1.500 Da y aproximadamente 3.000 Da, preferiblemente aproximadamente 3.000 Da.

En otra forma de realización particular, la fase Pi del sistema bifásico acuoso de PEG/Pi comprende un tampón KH_2PO_4 pH 7 que contiene NaCl al 10% (p/p).

Según el método de obtención de un extracto de proteína enriquecido en SOD de la invención, se obtiene un extracto de proteína enriquecido en SOD de una biomasa de una microalga de la especie *T. chuii* en la fracción acuosa de fosfato.

Dicho extracto de proteína enriquecido en SOD de una biomasa de una microalga de la especie *T. chuii* obtenido según el método de obtención de un extracto de proteína enriquecido en SOD de la invención, de aquí en adelante denominado el "extracto de proteína enriquecido en SOD de la invención", constituye un aspecto inventivo adicional de la presente invención.

La actividad SOD en el extracto de proteína enriquecido en SOD de la invención puede variar ampliamente; no obstante, en una forma de realización particular, la actividad SOD en el extracto de proteína enriquecido en SOD de la invención es igual a o mayor del 50%, habitualmente igual a o mayor del 60%, normalmente igual a o mayor del 70%, preferiblemente igual a o mayor del 80%, incluso más preferiblemente igual a o mayor del 90%.

Debido a la presencia de actividad SOD en el extracto de proteína enriquecido en SOD de la invención, dicho extracto de proteína se puede usar en los mismos usos y aplicaciones que los previamente mencionados en relación con la biomasa de *T. chuii* enriquecida en SOD de la invención.

Usos de la biomasa de *T. chuii* enriquecida en SOD, de la biomasa tratada con salmuera de la microalga de la especie *T. chuii* enriquecida en SOD y del extracto de proteína enriquecido en SOD

Debido a la presencia de actividad SOD en la biomasa de *T. chuii* enriquecida en SOD de la invención, dicha biomasa de *T. chuii* enriquecida en SOD de la invención muestra actividad antioxidante y/o antiinflamatoria y se puede usar en las industrias alimenticia, cosmética y/o farmacéutica como un ingrediente activo nutricional, ingrediente activo cosmético o ingrediente activo farmacéutico. Similarmente, la biomasa estabilizada de *T. chuii* enriquecida en SOD de la invención (es decir, la biomasa deshidratada de una microalga de la especie *T. chuii* enriquecida en SOD y la biomasa tratada con salmuera de una microalga de la especie *T. chuii* enriquecida en SOD) así como el extracto de proteína enriquecido en SOD de la invención, muestran actividad antioxidante y/o antiinflamatoria y se puede usar en las industrias alimenticia, cosmética y/o farmacéutica como un suplemento de un producto alimenticio o como un principio activo cosmético o farmacéutico.

Por simplicidad, el término genérico "producto activo de la invención" se referirá a la biomasa de *T. chuii* enriquecida en SOD de la invención, la biomasa estabilizada de *T. chuii* enriquecida en SOD de la invención y al extracto de proteína enriquecido en SOD de la invención, a menos que se indique de otra manera.

Por tanto, en un aspecto, la invención se refiere al uso de un producto activo de la invención como un suplemento para un producto alimenticio.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un producto alimenticio que comprende el producto activo de la invención. Como se usa en el presente documento, el término "producto alimenticio" se refiere a cualquier sustancia o producto de cualquier naturaleza, sólido o líquido, natural o procesado que debido a sus características, aplicaciones, componentes, preparación y estado de conservación, se puede usar habitual o idealmente para alguno de los siguientes fines: a) como nutrición normal para seres humanos o animales o como alimentos agradables; o b) como productos dietéticos, en casos especiales de alimentos humanos o animales; por tanto, la definición cubre en términos generales todos los materiales naturales y productos acabados de cualquier origen que, por separado o convenientemente mezclados entre sí, son adecuados en la dieta de seres humanos o animales. Un producto alimenticio listo para comer es el que no necesita diluirse por medio de una solución acuosa adecuada para consumo, por ejemplo. En principio, los ingredientes presentes en un producto alimenticio listo para comer están equilibrados y no hay necesidad de añadir ingredientes adicionales al producto alimenticio para hacerlo listo para comer, considerado por un experto en la materia. Un producto alimenticio concentrado es ese en que uno o más ingredientes están presentes a una mayor concentración que en un producto alimenticio listo para comer, por tanto, para usarlo es necesario diluirlo por medio de una solución acuosa adecuada para el consumo, por ejemplo. Ejemplos ilustrativos no limitantes de productos alimenticios proporcionados por esta invención incluyen productos lácteos tal como leche, yogures, margarinas; bebidas como zumos y bebidas deportivas; alimentos tal como galletas, panes, cereales, pasta, salsas, etc.

En una forma de realización particular, el producto alimenticio comprende entre el 0,001% y el 99,998% en peso del producto activo de la invención.

El producto alimenticio que comprende el producto activo de la invención se puede preparar fácilmente añadiendo el producto activo de la invención al producto alimenticio y mezclando la mezcla resultante.

En otro aspecto, se desvela un producto nutracéutico que comprende el producto activo de la invención. Como se usa en el presente documento, el término "nutracéutico", que deriva de los términos "nutrición" y "farmacéutico", se refiere a un producto hecho a partir de un alimento pero que se encuentra en una cápsula, polvo u otras formas farmacéuticas no habitualmente asociadas con alimentos y que tienen propiedades beneficiosas para el tratamiento y/o prevención de enfermedades. Por tanto, el término "producto nutracéutico" incluye productos alimenticios aislados o purificados, así como aditivos o suplementos alimenticios que generalmente se presentan en formas farmacéuticas normalmente usadas por vía oral, por ejemplo, cápsulas, comprimidos, bolsitas, viales bebibles, etc.; tales productos proporcionan un beneficio fisiológico o protección contra enfermedades. Si se desea, el producto nutracéutico desvelado puede

contener, además del producto activo de la invención, uno o más nutracéuticos (productos o sustancias asociados con la prevención o reducción de enfermedades), por ejemplo, flavonoides, ácidos grasos omega 3, etc., y/o uno o más prebióticos (ingredientes alimenticios no digeribles que estimulan la actividad y/o crecimiento probiótico), por ejemplo, oligofructosa, pectina, inulina, galacto-oligosacáridos, lactulosa, oligosacáridos de leche humana, fibra alimentaria, etc.

En un aspecto particular, el producto nutracéutico desvelado comprende el producto activo de la invención y un soporte oral aceptable para el mismo. En otro aspecto particular, la composición nutracéutica desvelada comprende entre el 0,001% y el 99,998% en peso del producto activo de la invención. En otro aspecto particular, el producto activo en la composición nutracéutica desvelada está contenido en una fase acuosa de dicha composición. En otro aspecto particular, la composición nutracéutica desvelada comprende una emulsión de aceite en agua.

En otro aspecto, se desvela el uso del producto activo de la invención como un suplemento alimentario. Como se usa en el presente documento, el término “suplemento alimentario”, se refiere a fuentes concentradas de nutrientes u otras sustancias con un efecto nutricional o fisiológico cuyo fin es suplementar la dieta normal. Se comercializan en forma ‘de dosis’, es decir, como píldoras, comprimidos, cápsulas, líquidos en dosis medidas, etc.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso del producto activo de la invención como un cosmético.

Por tanto, en otro aspecto, se desvela una composición cosmética que comprende el producto activo de la invención junto con un vehículo cosméticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, el término “composición cosmética” o “composición de cuidado personal” se refiere a una composición adecuada para su uso en la higiene personal de seres humanos o animales, o para aumentar la belleza natural o cambiar el aspecto del cuerpo sin afectar la estructura o funciones del cuerpo humano o animal, que comprende uno o más productos que proporcionan tales efectos. Si se desea, la composición cosmética desvelada puede contener, además del producto activo de la invención, uno o más cosméticos o productos cosméticos, es decir, sustancias o mezclas que se pretende colocar en contacto con las partes externas de cuerpo humano o animal (por ejemplo, epidermis, sistema capilar, uñas, labios, etc.) o con los dientes o la mucosa de la boca, para el fin exclusivo o principal de limpiarlos, perfumarlos, cambiar su aspecto, protegerlos, mantenerlos en buen estado o corregir olores corporales. Los ejemplos ilustrativos de productos cosméticos incluyen los productos contenidos en la lista INCI (nomenclatura internacional de productos cosméticos). Las composiciones cosméticas o de cuidado personal incluyen productos tal como bálsamos, almohadillas, pomadas, cremas, etc.

En un aspecto particular, la composición cosmética desvelada comprende un producto activo de la invención y un soporte oral o tópico aceptable para el mismo.

En otro aspecto particular, la composición cosmética desvelada comprende entre el 0,001% y el 99,998% en peso del producto activo de la invención.

La composición cosmética que comprende el producto activo de la invención se puede preparar fácilmente añadiendo y mezclando los diferentes ingredientes de dicha composición cosmética.

La composición cosmética desvelada se puede usar en la prevención, alivio, o tratamiento de daño de piel de mamífero, para la hidratación de la piel o como un agente anti-edad.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso del producto activo de la invención como un antioxidante.

En otro aspecto, se desvela el uso del producto activo de la invención como un medicamento, o, alternativamente expresado, la invención se refiere al producto activo de la invención para su uso en medicina.

Por tanto, en otro aspecto, se desvela una composición farmacéutica que comprende un producto activo de la invención junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, un soporte oral o tópico aceptable. Se puede encontrar información sobre excipientes adecuados para la formulación de composiciones farmacéuticas, así como sobre la producción de dichas composiciones farmacéuticas en el libro “Tratado de Farmacia Galénica”, por C. Faulí i Trillo, 10ª Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

En un aspecto particular, la composición farmacéutica desvelada comprende entre el 0,001% y el 99,998% en peso del producto activo de la invención.

La composición farmacéutica que comprende el producto activo de la invención se puede preparar fácilmente añadiendo y mezclando los diferentes ingredientes de dicha composición farmacéutica. Se puede encontrar información sobre soportes o excipientes adecuados para la formulación de composiciones farmacéuticas, así como sobre la producción de dichas composiciones farmacéuticas en el libro “Tratado de Farmacia Galénica”, por C. Faulí i Trillo, 10ª Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

En otro aspecto, la invención se refiere al producto activo de la invención para uso en la prevención y/o tratamiento de

una enfermedad o afección caracterizada por un estrés oxidativo y/o por una actividad inflamatoria, o en mejorar la tolerancia a radioterapia; o, expresado de una manera alternativa, también se desvela el uso del producto activo de la invención en la fabricación de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad o afección caracterizada por un estrés oxidativo y/o por una actividad inflamatoria, o en mejorar la tolerancia a radioterapia.

Como se usa en el presente documento, la expresión "enfermedad o afección caracterizada por una actividad de estrés oxidativo" se refiere a una enfermedad o afección en donde el estrés oxidativo está implicado. El estrés oxidativo refleja un desequilibrio entre la manifestación sistémica de especies de oxígeno reactivo y la capacidad de un sistema biológico de detoxificar fácilmente los intermedios reactivos o reparar el daño resultante. Las alteraciones en el estado redox normal de células pueden producir efectos tóxicos a través de la producción de peróxidos y radicales libres que dañan todos los componentes de la célula, incluyendo proteínas, lípidos y ADN. Además, algunas especies oxidativas reactivas actúan como mensajeros celulares en señalización redox; por tanto, se piensa que el estrés oxidativo está implicado en el desarrollo del cáncer; enfermedades neurodegenerativas, tal como, por ejemplo, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Lou Gehrig, enfermedad de Huntington y esclerosis múltiple; enfermedades cardiovasculares, tal como, por ejemplo, ateroesclerosis, insuficiencia cardiaca, hipertensión, infarto de miocardio, etc.; así como en otras enfermedades tal como, por ejemplo, síndrome X frágil, anemia falciforme, liquen plano, vitiligo, autismo, infección y síndrome de fatiga crónica.

Como se usa en el presente documento, la expresión "enfermedad o afección caracterizada por una actividad inflamatoria" se refiere a una enfermedad o afección en donde está implicada inflamación. La inflamación es una respuesta inmunovascular protectora que implica células inmunitarias, vasos sanguíneos, y mediadores moleculares. El fin de la inflamación es eliminar la causa inicial de la lesión celular, limpiar células necróticas y tejidos dañados de la lesión original y el proceso inflamatorio, e iniciar la reparación de tejido. Las anomalías inflamatorias son un grupo grande de trastornos que subyacen una gran variedad de enfermedades humanas. El sistema inmunitario con frecuencia está implicado con trastornos inflamatorios, demostrado tanto en reacciones alérgicas como en algunas miopatías, produciendo muchos trastornos del sistema inmunitario inflamación anormal. Las enfermedades no inmunitarias con origines etiológicos en procesos inflamatorios incluyen cáncer, ateroesclerosis, cardiopatía isquémica (isquemia miocárdica). Ejemplos ilustrativos, no limitantes de trastornos asociados con inflamación incluyen: acné vulgar, lesión renal aguda, asma, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades autoinflamatorias, enfermedad de Behçet, enfermedad celiaca, prostatitis crónica, colitis, enfermedad de Crohn, dermatitis, retinopatía diabética, enfisema, fibrosis, glomerulonefritis, hipersensibilidades (alergias), enfermedades intestinales inflamatorias, cistitis intersticial, miopatías, enfermedad inflamatoria pélvica, enfermedad de Peyronie, lesión de isquemia-reperfusión, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerosis, lesiones cutáneas, lupus eritematoso sistémico, rechazo a trasplante, enfermedad inflamatoria del aparato urinario, vasculitis, etc.

En una forma de realización particular, la enfermedad o afección caracterizada por un estrés oxidativo o actividad inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en cáncer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Lou Gehrig, enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple, ateroesclerosis, insuficiencia cardiaca, hipertensión, infarto de miocardio, síndrome X frágil, anemia falciforme, liquen plano, vitiligo, autismo, infección, síndrome de fatiga crónica, cardiopatía isquémica, acné vulgar, lesión renal aguda, asma, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades autoinflamatorias, enfermedad de Behçet, enfermedad celiaca, prostatitis crónica, colitis, enfermedad de Crohn, dermatitis, retinopatía diabética, enfisema, fibrosis, glomerulonefritis, hipersensibilidades (alergias), enfermedades intestinales inflamatorias, cistitis intersticial, miopatías, enfermedad inflamatoria pélvica, enfermedad de Peyronie, lesión de isquemia-reperfusión, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerosis, lesiones cutáneas, lupus eritematoso sistémico, rechazo a trasplante, enfermedad inflamatoria del aparato urinario y vasculitis.

También se desvela un método para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad o afección caracterizada por un estrés oxidativo y/o por una actividad inflamatoria, o en mejorar la tolerancia a radioterapia, que comprende administrar a un sujeto en necesidad de ello una cantidad terapéuticamente eficaz de un producto activo de la invención.

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" incluye cualquier animal mamífero incluyendo el ser humano.

Los particulares del producto activo de la invención ya se han definido anteriormente y se incorporan aquí por referencia.

Uso de una solución de salmuera rica en magnesio

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de una salmuera que comprende entre 10 y 18 g/l de azufre total (S), entre 40 y 55 g/l de sulfato (SO_4^{2-}), entre 60 y 1.500 mg/l de calcio (Ca^{2+}), entre 52 y 70 g/l de magnesio (Mg^{2+}), entre 15 y 20 g/l de potasio (K^+), entre 9 y 20 g/l de potasio (Na^+); entre 115 y 180 g/l de cloruro (Cl^-), y tiene una densidad entre 1,25 y 1,30 g/ml a 20ºC como un estabilizante de SOD comprendido en una biomasa de una microalga que contiene SOD, en donde dicha biomasa es la biomasa de una microalga de la especie *T. chuii* enriquecida en SOD según la invención.

La biomasa de cualquier microalga que contiene actividad SOD se puede estabilizar con dicha solución de salmuera rica en magnesio; no obstante, dicha biomasa de una microalga que contiene SOD es la biomasa de *T. chuii* enriquecida en SOD de la invención.

En otro aspecto, la invención se refiere a una biomasa de *T. chuii* enriquecida en SOD de la invención caracterizada en que SOD se estabiliza con una salmuera, en donde la salmuera comprende entre 10 y 18 g/l de azufre total (S), y entre 40 y 55 g/l de sulfato (SO_4^{2-}), y entre 60 y 1.500 mg/l de calcio (Ca^{2+}), y entre 52 y 70 g/l de magnesio (Mg^{2+}), y entre 15 y 20 g/l de potasio (K^+), y entre 9 y 20 g/l de potasio (Na^+); y entre 115 y 180 g/l de cloruro (Cl^-), y tiene una densidad entre 1,25 y 1,30 g/ml a 20ºC, en donde dicha biomasa es la biomasa de una microalga de la especie *T. chuii* enriquecida en SOD según la invención.

En una forma de realización particular, la salmuera se añade a una biomasa de una microalga que contiene SOD que está sustancialmente libre del medio de cultivo, de tal modo que el producto resultante, es decir, la biomasa de una microalga de la especie de *T. chuii* enriquecida en SOD en donde SOD se estabiliza con una salmuera, tiene esencialmente la misma composición que la composición de la salmuera, es decir, la biomasa de una microalga de la especie de *T. chuii* enriquecida en SOD caracterizada en que SOD se estabiliza con una salmuera, en donde la salmuera comprende entre 10 y 18 g/l de azufre total (S), entre 40 y 55 g/l de sulfato (SO_4^{2-}), y entre 60 y 1.500 mg/l de calcio (Ca^{2+}), y entre 52 y 70 g/l de magnesio (Mg^{2+}), y entre 15 y 20 g/l de potasio (K^+), y entre 9 y 20 g/l de potasio (Na^+); y entre 115 y 180 g/l de cloruro (Cl^-), y tiene una densidad entre 1,25 y 1,30 g/ml a 20ºC.

En otra forma de realización particular, la salmuera se añade a una biomasa de una microalga que contiene SOD que comprende un cierto volumen de medio de cultivo, de tal modo que el producto resultante, es decir, la biomasa de una microalga de la especie de *T. chuii* enriquecida en SOD en donde SOD es estabiliza con una salmuera, tiene una composición que esencialmente se diferencia de la composición de la salmuera. La composición de dicho producto resultante dependerá de las cantidades relativas de salmuera y biomasa que se mezclan para obtener dicho producto. En una forma de realización particular, la proporción entre la salmuera y la biomasa de una microalga que contiene SOD es desde aproximadamente 1000:1 hasta aproximadamente 1:1000, desde aproximadamente 100:1 hasta aproximadamente 1:100, desde aproximadamente 50:1 hasta aproximadamente 1:50, desde aproximadamente 25:1 hasta aproximadamente 1:25; desde aproximadamente 10:1 hasta aproximadamente 1:10; desde aproximadamente 5:1 hasta aproximadamente 1:5, aproximadamente 1:1.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no se deben considerar como limitantes de la misma.

Ejemplo 1

Producción de SOD en diferentes especies de microalgas en diferentes sistemas y condiciones de cultivo

Este ensayo se realizó para estudiar la producción de SOD en diferentes especies de microalgas en diferentes sistemas y condiciones de cultivo. Para ese fin, se ensayaron un total de 11 cepas de microalgas en diferentes condiciones de estrés abiótico en diferentes sistemas de cultivo incluyendo cultivos interiores y exteriores para ver cómo estos afectaban la actividad SOD de las diferentes cepas. Como se muestra posteriormente, se encontró que *Tetraselmis chuii* tenía la mayor actividad SOD en todas las condiciones abióticas probadas, aunque la mayor actividad se obtuvo con ausencia de nitrógeno.

1. Materiales y métodos

1.1 Cultivos de microalgas

Las algas *Chlorella vulgaris*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Tetraselmis suecica*, *Tetraselmis chuii*, *Tetraselmis sp.*, *Nannochloropsis gaditana*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Isochrysis galbana (Clon T-ISO)*, *Porphyridium cruentum*, y *Scenedesmus obliquous* se obtuvieron de la colección de cultivos de microalgas de Fitoplancton Marino, S.L.

T. suecica, T. chuii, *Tetraselmis sp.*, *N. gaditana*, *I. galbana (Clon T-ISO)* y *P. cruentum* se cultivaron en medio de cultivo F/2 [Guilard R. R. L. & Ryther, J. H. 1962. “Studies of marine planktonic diatoms. I. Cyclotela nana Hustedt and Detonula confervaceae (Cleve) Gran.” Can. J. Microbiol. 8, 229-239]. *P. tricornutum* se cultivó en medio de cultivo F/2 + Si [Guilard & Ryther, 1962, citado anteriormente]. *Ch. vulgaris*, *Ch. pyrenoidosa* y *S. obliquous* se cultivaron con medio Bold Basal con vitaminas [Bischoff, H. W. & Bold, H. C. 1963. “Phycological Studies IV. Some Soil Algae from Enchanted Rock and Related Algal Species.” University of Texas Publicación No. 6318, Austin, Texas; Starr R.C. & Zeikus J.A. 1993. “UTEX – The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin” J. Phycol. Supl. 29]. Todos los medios se prepararon recientes a partir de productos químicos secos.

Se inocularon cultivos iniciales de 50 ml (en fase logarítmica media) a 800 ml de medio en matraces Erlenmeyer de 1.000 ml. Los matraces Erlenmeyer se colocaron en una sala a temperatura control a 25 ± 1ºC con luz fluorescente blanca fría continua de 150 µmol fotón m^{-2} s^{-1}. Los cultivos se airearon con CO_2 a aproximadamente el 2% en aire atmosférico. Cada semana, 50 ml de un cultivo se transfirieron a un nuevo matraz que contenía medio reciente. Estos

cultivos se mantuvieron subcultivando cada semana y se usaron como inóculo para experimentos en interior y exterior.

1.2 Condiciones de cultivo

Se establecieron las condiciones de cultivo experimentales, manteniendo tres replicados en cada uno: condición control, que corresponde a la condición de mantenimiento del cultivo madre; condiciones interiores y exteriores en las que los cultivos se sometieron a condiciones de alto redox, condiciones de alta temperatura, ausencia de nitrógeno y condiciones de alta salinidad.

Los cultivos se operaron en modo de lote alimentado para prevenir la limitación de nutrientes. Los cultivos se hicieron crecer a la fase logarítmica antes de que se aplicaran las condiciones abióticas. Las velocidades de crecimiento se siguieron por recuentos celulares de microscopía. Se construyeron curvas de crecimiento (no mostrado) para confirmar la identificación de la fase de crecimiento ya que esto depende de la cepa de se cultiva.

Se obtuvieron condiciones de alto redox, en las que los medios de cultivo se mantuvieron con un potencial redox de al menos 100 mV, mediante la adición de ozono. Para cultivos de pequeño volumen, el ozono se generó en el medio mediante un generador de ozono OZC-PLUS 200 con un controlador de potencial de oxidación/reducción (POR). Para volúmenes grandes, se usó un generador de ozono Oxicom SLV 250 en donde la concentración de ozono disuelto en el medio se controló midiendo el POR continuamente mediante un controlador digital de POR mV 600 de Hannah Instruments.

Las condiciones de alta temperatura, en las que los cultivos se mantuvieron, se obtuvieron a una temperatura mayor de 28ºC. Para cultivos interiores, la temperatura de la sala de cultivo se ajustó por encima de esta temperatura. Para cultivos exteriores, los cultivos se tuvieron que hacer durante los periodos de primavera y verano, es decir, cuando la temperatura se alcanzó de forma natural por la temperatura medioambiental.

Las condiciones de alta salinidad, en las que los medios de cultivo se cultivaron, se obtuvieron cultivando los medios de cultivo a una salinidad mayor de 35 añadiendo sales al medio. La salinidad se midió usando un HI 9828 Multiparameter de Hanna Instruments.

Las condiciones de ausencia de nitrógeno se encontraron no añadiendo nitrógeno a los medios y por tanto siendo consumido por el cultivo. La concentración de nitrógeno se determinó mediante un autoanalizador AQ2 de Seal.

1.3 Sistemas de cultivo

Los cultivos interiores se realizaron en matraces Erlenmeyer de 5 L. Los cultivos exteriores se realizaron en sistemas abiertos o cerrados.

Los sistemas abiertos usados eran estanques con canales de recirculación. Los cultivos se llevaron a cabo en estanques con canales de recirculación abiertos acrílicos de 6 l y 600 l que contenían 5 l y 500 l, respectivamente, de medio de cultivo. Los cultivos se movieron usando una rueda con palas que rota a 18 revoluciones por minuto (rpm). Este estanque con canales de recirculación se construyó con un diseño adoptado de estudios previos [Radmann, E.M. et al, 2007, Aquaculture 2007, 265: 118–126].

Los sistemas cerrados usados eran fotobiorreactores (FBR) tubulares que consistían en una bomba que dirige el medio de cultivo a través de receptor solar tubular horizontal. El volumen total de cultivo en el biorreactor era 650 l y 2.000 l.

Tanto los estanques con canales de recirculación como los fotobiorreactores usaron inyección de CO_2 puro para controlar el pH en el cultivo mediante controlador de pH y caudalímetros. El pH se ajustó a 7,8.

La biomasa se recogió directamente de los diferentes cultivos centrifugados en una centrífuga de lotes, a 5.000 rpm durante 15 minutos. La biomasa recogida tenía un 80% de humedad. La pasta de biomasa se lavó con agua destilada para eliminar material no biológico tal como precipitados de sales minerales. Las muestras de biomasa de microalgas que se van a analizar para actividad SOD y para la preparación del sistema de dos fases acuosas se estabilizó bien por liofilización o añadiendo la pasta a una solución de salmuera rica en magnesio. Esta solución de salmuera se obtuvo por evaporación de agua de mar.

1.4 Extracción y medida de proteína

La extracción de proteína y los extractos de SOD se obtuvieron por adición de 1 ml de tampón de extracción (tampón KH_2PO_4 220 mM pH 7,8) a 0,1 g de biomasa de microalgas. Las células se lisaron usando ultrasonidos durante 2 min con intervalos de 10 segundos (4 ciclos de 30 segundos cada uno, amplificación del 20%). La biomasa se centrifugó después a 16.000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente y el sobrenadante se recogió. La concentración de proteína se determinó por el tradicional método de Bradford [Bradford M. M. 1976. “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.” Analyt. Biochem. 72,

248–254].

1.5 Ensayo de enzima

La actividad SOD se ensayó en todos los experimentos siguientes siguiendo la velocidad de reducción de citocromo *c* en un sistema acoplado, usando xantina y xantina oxidasa a Pi 216 mM, pH 7,8, como se menciona posteriormente [McCord, J. M. y Fridovich, I. (1969) J. Biol. Chem. 244, 6049 6055; Procedimiento actualizado de SOP 10-30-6299 y OP SPCYTO01].

Ensayo enzimático de superóxido dismutasa

El objetivo de este ensayo es estandarizar un procedimiento para la determinación enzimática de superóxido dismutasa (SOD). Este procedimiento se aplica a todos los productos que tienen una especificación para actividad superóxido dismutasa por determinación enzimática.

Definiciones

Agua purificada = agua de un sistema desionizante, resistividad > o = 18MΩ•cm @ 25ºC
Definición de unidad- Una unidad inhibirá la velocidad de reducción de citocromo c en el 50% en un sistema acoplado, usando xantina y xantina oxidasa a pH 7,8 a 25ºC en un volumen de reacción de 3,0 ml. La concentración de xantina oxidasa debe producir una ΔA_{550nm} inicial (sin inhibir) de 0,025 +/- 0,005 por minuto
XOD - xantina oxidasa
SOD - Superóxido dismutasa
$O2^{-}\cdot$ - Radical superóxido

Discusión

El radical superóxido se produce enzimáticamente por la reacción catalizada por la xantina oxidasa:
Xantina + O_2 + H_2O $\xrightarrow{XOD}$ ácido úrico + $O_2^{-}\cdot$ + H^+
El citocromo c oxidado se reduce por el radical superóxido. La velocidad de reducción se sigue espectrofotométricamente a 550 nm:
Citocromo^{3+} *c* + $O_2^{-}\cdot$ —> Citocromo^{2+} *c* + O_2
La superóxido dismutasa inhibe la reducción de citocromo *c* compitiendo por el radical superóxido:
2 $O_2^{-}\cdot$ + 2 H^+ $\xrightarrow{SOD}$ O_2 + H_2O_2

Procedimiento

Condiciones: T = 25°C, pH = 7,8, A_{550nm}, paso de luz = 1 cm
Método: Determinación de velocidad espectrofotométrica continua
Reactivos:

A) Tampón fosfato de potasio 216 mM, pH 7,8 a 25ºC (tampón) [preparar una solución de 49,3 mg/ml de fosfato de potasio dibásico trihidrato, Número de producto de Sigma-Aldrich P5504 en agua purificada; ajustar el pH a 7,8 a 25ºC con KOH 1 M o HCl 1M];
B) Solución de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 10,7 mM [preparar una solución de 4,0 mg/ml de sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético dihidrato, Número de producto de Sigma-Aldrich ED2SS en agua purificada];
C) Solución de citocromo c (Cit C) 1,1 mM [preparar una solución de citocromo c a 14,6 mg/ml, Número de producto de Sigma-Aldrich C7752 en agua purificada];
D) Solución de xantina (xantina) 0,108 mM [disolver 1,64 mg de xantina, número de producto de Sigma-Aldrich X0626 en 90 ml de agua purificada; con agitación, añadir pequeñas cantidades de KOH 1 N hasta que toda la xantina se haya disuelto; transferir cuantitativamente la solución a un matraz aforado de 100 ml y cs hasta 100 ml con agua purificada];
E) Solución de enzima xantina oxidasa (XOD) [preparar una solución que contiene aproximadamente 5 unidades/ml de xantina oxidasa, número de producto de Sigma-Aldrich, X1875 en agua purificada fría. Colocar en hielo; inmediatamente antes de usar, preparar una solución en agua purificada fría que contiene 0,05 unidades/ml de xantina oxidasa usando xantina oxidasa, número de producto de Sigma-Aldrich, X1875. Esta concentración puede necesitar ajustarse parta cumplir los requisitos del ensayo; y
F) Solución de enzima superóxido dismutasa [inmediatamente antes del uso, preparar una solución que contiene 10 unidades/ml de superóxido dismutasa en agua purificada fría].

Procedimiento del ensayo

Preparar una mezcla de reacción pipeteando (en mililitros) los siguientes reactivos en un recipiente adecuado:

Agua purificada	23,0
Reactivo A (Tampón)	25,0
Reactivo B (EDTA)	1,0
Reactivo C (CitoC)	1,0
Reactivo D (Xantina)	50,0

Mezclar para obtener una mezcla (“G”) y ajustar el pH a 7,8 a 25ºC con HCl 1 M o KOH 1 M si es necesario.
Comprobación de xantina oxidasa:

Pipetear lo siguiente (en ml) en cubetas adecuadas:

	Blanco	**XOD**
Reactivo G (Mezcla)	2,80	2,80

Equilibrar a 25ºC usando un espectrofotómetro adecuadamente termostatizado.

Seguir la absorbancia a 550 nm hasta que sea constante, después añadir:

Agua purificada	0,20	0,10
Reactivo E (XOD)	-----	0,10

Mezclar por inversión y registrar el aumento en absorbancia a 550 nm durante aproximadamente 5 minutos. El cambio en absorbancia para la no inhibida frente al blanco debe ser 0,025+/-0,005 para esta reacción. Si no lo es, ajustar la concentración del reactivo E (XOD) y repetir la comprobación de xantina oxidasa.

Pipetear (en mililitros) los siguientes reactivos en cubetas adecuadas:

	Blanco	**Sin inhibir**	**Prueba-1**	**Prueba-2**	**Prueba-3**
Reactivo G (Mezcla)	2,80	2,80	2,80	2,80	2,80
Agua purificada	0,20	0,10	-----	0,01	0,02
Reactivo F (SOD)	-----	-----	0,10	0,09	0,08

Equilibrar a 25ºC usando un espectrofotómetro adecuadamente termostatizado.

Seguir la absorbancia a 550 nm hasta que sea constante, después añadir:

Reactivo E (XOD)	-----	0,10	0,10	0,10	0,10

Mezclar por inversión y registrar el aumento en absorbancia a 550 nm durante aproximadamente 5 minutos. Obtener la velocidad lineal más rápida durante un intervalo de un minuto para la reacción sin inhibir. Usando este intervalo de tiempo, obtener las velocidades para cada Prueba y el Blanco.

La ΔA_{550nm} para cada prueba inhibida de estar entre el 40-60% de la velocidad sin inhibir. Cualquier valor fuera de este intervalo se considera inválido.

Cálculos

7.5.1	Porcentaje de Inhibición:	$\frac{(\Delta A_{550nm}/min\ Sin\ inhibir - \Delta A_{550nm}/min\ Inhibida) \times (100)}{(\Delta A_{550nm}/min\ Sin\ inhibir - \Delta A_{550nm}/min\ Blanco)}$

	Unidades/ml de enzima:	**(Porcentaje de Inhibición)(FD)/(50%)(0,10)**

FD = Factor de dilución
50% = Inhibición de la velocidad de la reducción de citocromo *c* por la definición de unidad
0,10 = volumen (en ml) de enzima usada en cada prueba

Concentración de ensayo final

En una mezcla de reacción de 3,00 ml, las concentraciones finales son fosfato de potasio 50 mM, ácido etilendiaminotetraacético 0,1 mM, citocromo *c* 0,01 mM, xantina 0,05 mM, xantina oxidasa 0,005 unidades y superóxido dismutasa 1 unidad.

Definiciones:

a) Rendimiento (%) = $\frac{\text{Actividad enzimática total en una fracción purificada}}{\text{Actividad enzimática total en el extracto crudo}} \times 100$

b) La actividad específica de una enzima se define como:
Actividad específica (U/mg) = Actividad (unidades)/proteína (mg)

c) Pureza de la enzima = $\frac{\text{Cantidad de la enzima deseada (proteína)}}{\text{Cantidad de proteína total}}$

La actividad específica, la purificación en veces y el rendimiento en % para cada etapa de purificación se comparó al extracto crudo de partida inicial. La pureza de la enzima se midió usando el parámetro de purificación en veces. La purificación en veces es una medida de cuánto más pura es la proteína diana (es decir, SOD) después de una etapa de purificación en comparación con el extracto crudo. La purificación en veces se puede calcular dividiendo la actividad específica (U/mg de proteína) de la etapa purificada por la actividad específica (U/mg de proteína) del extracto crudo.

2. Resultados

La productividad de SOD de las diferentes cepas mencionadas anteriormente se probó en diferentes condiciones abióticas y sistemas, mostrada en la tabla 1.

Tabla 1
Descripción de los diferentes tratamientos usados en el cultivo de 11 cepas de microalgas

Tratamiento
Condiciones interiores
Condiciones estándar
RedOx > 100 mV (oxígeno reactivo)
Alta temperatura
Ausencia de Nitrógeno
Alta salinidad
Condiciones exteriores
Sistemas abiertos
Condiciones estándar
RedOx > 100 mV (oxígeno reactivo)
Alta temperatura
Ausencia de Nitrógeno
Alta salinidad
Sistemas cerrados
Condiciones estándar
RedOx > 100 mV (oxígeno reactivo)

Tratamiento
Alta temperatura
Ausencia de Nitrógeno
Alta salinidad

La producción media de las diferentes cepas probadas en condiciones estándar o con estrés abiótico no mostró aumentos significativos en la producción de SOD comparada con la obtenida por la microalga *T. chuii*, como se muestra en la figura 1.

Todas cepas, excepto *T. chuii* y otro género de *Tetraselmis*, mostraron valores de actividad SOD en el intervalo de 10-60 UI/mg de proteína soluble. Algunas especies como *P. tricornutum* y *N. gaditana* mostraron mayor actividad SOD, aproximadamente 100 UI/mg de proteína soluble. Sin embargo, *T. chuii* alcanzó una alta actividad SOD, es decir, aproximadamente 180 UI/mg de proteína soluble en condiciones estándar que aumentó a un máximo de actividad SOD de 715±15 UI/mg de proteína soluble cuando se cultivó con el estrés abiótico de ausencia de nitrógeno, seguido por una actividad SOD de 500 ±12,5 UI/mg de proteína soluble cuando *T. chuii* se cultivó con la agresión de alta temperatura alcanzando una actividad SOD de 410±48,9 UI/mg de proteína soluble cuando se cultivó con las condiciones de agresión de alta salinidad. Los resultados se muestran la figura 1. Por tanto, se encontró que *T. chuii* tenía la mayor actividad SOD en todas las condiciones abióticas ensayadas, aunque la mayor actividad se obtuvo con ausencia de nitrógeno. Por estas razones, *T. chuii* se seleccionó como microalga para la producción de actividad SOD en ensayos adicionales.

No hubo diferencias significativas en los resultados de actividad SOD obtenida en cultivos exteriores para los diferentes volúmenes de cultivo ensayados.

Ejemplo 2

Fraccionamiento y purificación parcial de la actividad SOD del extracto sin células de la microalga *T. chuii*

Este estudio se dirigía a desarrollar una estrategia de extracción económica para el fraccionamiento y purificación parcial de la actividad SOD del extracto sin células de la microalga *T. chuii*. Para ese fin, se desarrolló un sistema de dos fases acuosas de polietilenglicol/fosfato (PEG/Pi). Se llevó a cabo un estudio detallado para analizar el efecto de la masa molar del PEG, concentración, pH y composición iónica en el sistema sobre el comportamiento de reparto de la actividad SOD en la fase rica en fosfato. Como se muestra a continuación, dos sistemas de dos fases acuosas de PEG/Pi compuestos de:

PEG 1500: PEG al 12% p/p, Pi al 20% p/p suplementado con NaCl al 10% p/p, y
PEG 3000: PEG al 12% p/p, Pi al 20% p/p suplementado con NaCl al 3,5% p/p,

se seleccionaron como los sistemas con la mayor selectividad de SOD sobre proteínas totales de microalgas nativas. En estas condiciones, se logró suficiente purificación (2-4 veces) con alta recuperación (>80%) para la actividad SOD en la fase fosfato inferior. Además, esos sistemas permiten la eliminación de compuestos de bajo peso molecular indeseados, tal como clorofilas y polifenoles. La fase SOD/fosfato muestra alta termoestabilidad a 50ºC y 60ºC.

Materiales y Métodos

Extracto

En todos los casos, se usaron extractos sin células de la microalga *T. chuii* obtenidos como se describe en el ejemplo 1.

Preparación de sistemas de dos fases acuosas

Se prepararon sistemas de dos fases acuosas de polietilenglicol/fosfato (PEG/Pi) a partir de soluciones madre de PEG 1500, 3000 y 6000 al 50% (p/p) y de un 40% (p/p) de una solución madre de fosfato de potasio, pH 7,0. Las soluciones madre de PEG se prepararon disolviendo las cantidades calculadas de PEG en agua desionizada. La solución de fosfato se preparó en una proporción de 7:18 monobásico:dibásico disolviendo las cantidades calculadas de fosfato de potasio monobásico anhidro y fosfato de potasio dibásico anhidro en agua desionizada, ajustando el pH a 7,0 usando hidróxido de sodio (NaOH) 1 M o ácido clorhídrico (HCl) 1 M.

Se prepararon tampones fosfato de potasio que contenían diferentes concentraciones de NaCl añadiendo, en 25 g de tampón fosfato de potasio madre, 0,875 g de NaCl (3,5% p/p), 1,75 g de NaCl (7% p/p), 2,5 g de NaCl (10% p/p). El pH se ajustó a 7,0 usando NaOH 1 M o HCl 1 M.

Diferentes parámetros del sistema tal como el peso molecular del polímero (PEG), composición de sal y pH tienen un gran impacto en la distribución de proteína y rendimiento total.

Se prepararon ATPS de 2-100 g de masa que contenían las cantidades requeridas de PEG, solución de sal, extractos sin células de *T. chuii* (sobrenadante de microalgas, 10% del sistema total) y agua desionizada para equilibrar el peso total en tubos de plástico. Se preparó ATPS mezclando los tubos de ensayo suavemente durante 1 hora a 22-25ºC. Para alcanzar una separación de fases completa se realizó una centrifugación a baja velocidad a 1.500 rpm durante 10 minutos. Las fases se separaron pipeteando las fases superior e inferior cuidadosamente para evitar contaminación cruzada. El volumen de cada fase se midió y recogió.

Se añadieron varias cantidades y pesos moleculares de PEG (1500, 3000 y 6000 Da) así como de K_2HPO_4 usando diferentes pH (6,5, 7, 7,5, 8 y 8,5) y a diferentes concentraciones de NaCl (0% p/p, 3,5% p/p, 7% p/p y 10% p/p) a los extractos de microalgas para generar el sistema bifásico. La cantidad de K_2HPO_4 fue constante en todas las condiciones

Resultados

2.1 Optimización de ATPS para el extracto de microalgas

La distribución de una proteína particular depende de sus propiedades fisicoquímicas únicas, tal como tamaño, carga de superficie, hidrofobicidad, etc. Si se optimiza apropiadamente, ajustando cuidadosamente los factores que influyen la distribución de proteínas (por ejemplo, peso molecular de PEG, fuerza iónica, pH), se pueden salvar muchas de las desventajas de la centrifugación y ultrafiltración, comúnmente usadas en las fases iniciales de extracción y ofrecer un producto final parcialmente purificado y concentrado.

Considerando que los parámetros del ATPS, tal como el peso molecular del polímero (PEG), composición de sal y pH, tienen un gran impacto en la distribución de proteínas (Kp, coeficiente de reparto) y el rendimiento total, se diseñó un experimento factorial y se investigaron varias condiciones diferentes (figura 2). Los intervalos probados tanto para PEG como Pi fueron 11-20% (p/p). Se probaron tres pesos moleculares de PEG, es decir, 1500, 3000 y 6000. Las soluciones madre de PEG y Pi eran al 50% p/p y 40% p/p, pH 7, respectivamente. Posteriormente, las mejores condiciones con respecto a la purificación en veces de SOD en la fase Pi se seleccionaron para mejoras adicionales (figura 2). En todos los casos se usaron extractos sin células de *T. chuii*. La tabla 2 muestra las condiciones de PEG/Pi iniciales probadas.

Tabla 2
Condiciones iniciales experimentalmente probadas

Ejecuciones	PEG % p/p	Pi % p/p	PEG (g)	Pi (g)	Muestra	ddH_20	Peso total
1	15	17	0,300	0,430	0,100	0,170	1
2	20	12	0,400	0,304	0,100	0,196	1
3	12	17	0,240	0,430	0,100	0,230	1
4	19	15	0,380	0,380	0,100	0,141	1
5	16	11	0,320	0,278	0,100	0,302	1
6	16	19	0,320	0,481	0,100	0,099	1
7	18	16	0,360	0,405	0,100	0,135	1
8	11	18	0,220	0,455	0,100	0,225	1
9	17	15	0,340	0,380	0,100	0,181	1
10	12	20	0,240	0,506	0,100	0,154	1
11	18	12	0,360	0,304	0,100	0,236	1
12	15	20	0,300	0,506	0,100	0,094	1
13	11	13	0,220	0,329	0,100	0,351	1
14	13	18	0,260	0,455	0,100	0,185	1
15	17	14	0,340	0,354	0,100	0,206	1
16	20	14	0,400	0,354	0,100	0,146	1
17	14	19	0,280	0,481	0,100	0,139	1
18	13	11	0,260	0,278	0,100	0,362	1
19	19	13	0,380	0,329	0,100	0,191	1
20	14	16	0,280	0,405	0,100	0,215	1

Esas condiciones que produjeron la formación de fases PEG y Pi distintas y separadas se analizaron para actividad SOD. Los resultados se muestran en las figuras 3 y 4.

Basado en los resultados obtenidos después del cribado inicial, se seleccionaron las siguientes condiciones para análisis adicionales:

a) PEG 1500: ejecución 10; es decir, PEG al 12% p/p, Pi al 20% p/p [PEG 1500 (10)]
b) PEG 3000: ejecución 10; es decir, PEG al 12% p/p, Pi al 20% p/p [PEG 3000 (10)]

Las condiciones seleccionaron se aumentaron a escala hasta un peso final de 10 g para obtener resultados más precisos, como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3
Aumento a escala de las condiciones seleccionadas del cribado inicial

Ejecución	PEG 1500 (10)	PEG 3000 (10)
Purificación Veces	2,3	2,2
Rendimiento (%)	70	75

Las mejoras en la actividad específica de SOD (A.E., unidades/mg de proteína) para PEG 1500 y PEG 3000 se reprodujeron. La figura 5 muestra los tubos falcon con la separación de las fases PEG y Pi de las condiciones seleccionadas.

El siguiente paso incluía un paso de cribado adicional que probaba diferentes pH y concentraciones de NaCl. Las condiciones seleccionadas anteriormente se usaron para la mejora adicional de la pureza de SOD. La tabla 4 muestra las condiciones de pH/NaCl probadas.

Tabla 4
Condiciones de pH/NaCl ensayadas

Orden de ejecución	pH	NaCl (% p/p)
1	6,5	7
2	8,5	3,5
3	6,5	3,5
4	8,5	7
5	7,5	10
6	6,5	3,5
7	6,5	10
8	8,5	10
9	7,5	3,5
10	7,5	7
Control 1 (C1)	7	0
Control 2 (C2)	7	3,5
Control 3 (C3)	7	7
Control 4 (C4)	7	10
Control 5 (C5)	8,5	0
Control 6 (C6)	7,5	0
Control 7 (C7)	6,5	0

Las figuras 6-8 muestran la mejora de la purificación de las condiciones ensayadas de pH/NaCl.

Basado en los resultados anteriores, se seleccionaron las siguientes condiciones para el aumento a escala:

a) PEG 1500: 1, 2 y C4
b) PEG 3000: 1, 10 y C2
c) PEG 6000 (10): 1, 7 y C3

Las figuras 9-11 muestran los resultados del experimento de aumento a escala (10 g) de las condiciones seleccionadas anteriormente.

Cuando se probaron las mejores condiciones de pH/NaCl en un peso final de 10 g, todas las condiciones de PEG 6000 (10) mostraron contaminación de clorofila (figuras 12, 13 y 14) en la fase Pi y, por tanto, solo se seleccionaron PEG 1500 y PEG 300 para mejora adicional.

Por último, las condiciones seleccionadas finales después de ensayos de aumento a escala fueron las siguientes:

PEG 1500: C4, es decir, PEG al 12% p/p, Pi al 20% p/p suplementado con NaCl al 10% p/p, pH 7
PEG 3000: C2, es decir, PEG al 12% p/p, Pi al 20% p/p suplementado con NaCl al 3,5% p/p, pH 7.

Estos dos sistemas de dos fases acuosas de PEG/Pi se seleccionaron como los sistemas con la mayor selectividad de SOD sobre las proteínas totales de la microalga nativa *T. chuii*. En estas condiciones, se alcanzó suficiente purificación (2-4 veces) con alta recuperación (>80%) para SOD en la fase fosfato inferior. Además, ambos sistemas permiten la eliminación de compuestos de bajo peso molecular indeseados, tal como clorofilas y polifenoles.

2.2 Reproducibilidad del ATPS optimizado

Se investigó la reproducibilidad de las mejores condiciones del ATPS. Se realizaron tres experimentos independientes en tres días sucesivos. Se prepararon soluciones madre de fosfato y PEG recientes cada vez. Se resuspendieron células de *T. chuii* (0,1 g) en 1 ml de tampón Pi 220 mM, pH 7,8 y se lisaron aplicando ultrasonidos (4 ciclos de 30 segundos cada uno, amplificación del 20%). Las células se precipitaron (16.000xg durante 20 minutos) y el sobrenadante se sometió a reparto en ATPS. El paso final del ATPS era 10 g y las concentraciones finales eran:

- PEG 1500: PEG al 12% p/p, Pi al 20% p/p suplementado con NaCl al 10% p/p (concentraciones finales)
- PEG 3000: PEG al 12% p/p, Pi al 20% p/p suplementado con NaCl al 3,5% p/p (concentraciones finales)

Se calcularon las veces de purificación y el rendimiento de purificación para la fase Pi para cada experimento. Los resultados se muestran en la tabla 5 y la figura 15.

Tabla 5.
Valores de purificación-veces y purificación-rendimiento (%) para PEG 1500 y PEG 3000 expresados como media ± desviación estándar de 3 experimentos independientes

PEG	Veces de Purificación	Rendimiento de Purificación (%)
PEG 1500	2,3±0,2	81±5
PEG 3000	3,7±0,7	85±4,5

2.3 Experimento de aumento a escala de ATPS

La reproducibilidad de las condiciones de ATPS optimizadas se probó en una preparación final de 100 g. Las condiciones que habían mostrado las mejores mejoras de purificación en veces y rendimiento de purificación eran las siguientes:

- PEG 1500: PEG al 12% p/p, Pi al 20% p/p suplementado con NaCl al 10% p/p (concentraciones finales)
- PEG 3000: PEG al 12% p/p, Pi al 20% p/p suplementado con NaCl al 3,5% p/p (concentraciones finales)

Procedimiento:

Se lisó 1 g de células de *T. chuii* en 10 ml de tampón Pi 220 mM, pH 7,8. Las células se lisaron aplicando ultrasonidos como sigue: 10 x 40 segundos en hielo, amplitud del 40% usando una punta pequeña. Posteriormente, las células se centrifugaron durante 20 minutos a 16.000xg y el sobrenadante se usó para montar el ATPS. El ATPS final consistía en 24 g de PEG, 50 g de Pi, 10 g de extracto de células y 16 g de ddH_2O. Las mezclas se rotaron durante 1 h a temperatura ambiente, seguido por centrifugación suave a 1.500 rpm durante 10 min para acelerar la separación de fases.

La actividad SOD en la fase Pi se determinó empleando el ensayo de citocromo *c* (ejemplo 1); la concentración total de proteína se midió por el ensayo de Bradford (citado anteriormente). Se calcularon la purificación en veces y el rendimiento de purificación. Los resultados se muestran en la figura 16. Como se muestra en dicha figura 16, de nuevo se alcanzó suficiente purificación (3-5 veces) con alta recuperación (≥80%) para SOD en la fase fosfato inferior.

2.4 Tratamiento con calor del extracto crudo y Pi dirigido a la mejora de la actividad específica

El fin de este experimento era investigar si un tratamiento térmico de la fracción del extracto crudo, antes de la aplicación al ATPS, podría mejorar la actividad específica de SOD.

Para el tratamiento con calor del extracto crudo, se lisaron 0,1 g de células de *T. chuii* como se ha descrito previamente

y se centrifugó a 16.000xg durante 20 minutos; posteriormente, el extracto crudo del sobrenadante se sometió a incubación térmica a 2 temperaturas diferentes: 40ºC y 50ºC. Se retiraron alícuotas a diferentes tiempos y se determinó la actividad SOD total empleando el ensayo de citocromo *c*. Además, la concentración total de proteína se midió por el ensayo de Bradford (citado anteriormente). Los resultados se muestran en las figuras 17 y 18.

Para el tratamiento con calor de la fase Pi después del ATPS, se probó la misma hipótesis usando la fase Pi de las dos condiciones de ATPS optimizadas (PEG 1500 y PEG 3000). Después del ATPS, la fase Pi se sometió a tratamiento con calor a 50ºC y 60ºC. Los resultados de la fase Pi de PEG 1500 se muestran en las figuras 19 y 20. Los resultados de la fase Pi de PEG 3000 se muestran en las figuras 21 y 22. Estos resultados muestran que la fase SOD/fosfato muestra alta termoestabilidad a 50ºC y 60ºC.

2.5 Formación de fases en ATPS sin centrifugación

Se investigó la posibilidad de formación de las dos fases (PEG y Pi), así como la interfase entre ellas, sin centrifugación, usando las dos condiciones optimizadas de ATPS. Esto facilitaría a producción a gran escala y disminuiría el coste del proceso. Las condiciones eran las siguientes:

- PEG 1500: PEG al 12% p/p, Pi al 20% p/p suplementado con NaCl al 10% p/p (concentraciones finales)
- PEG 3000: PEG al 12% p/p, Pi al 20% p/p suplementado con NaCl al 3,5% p/p (concentraciones finales)

Las mezclas (aproximadamente 40 g de peso final) se dejaron a temperatura ambiente para equilibrar después de la rotación durante 1 h. Se observó la separación de fases solo en el caso de PEG 1500 después de incubación durante toda la noche. Los resultados se reprodujeron usando un sistema de 65 g. Se muestran fotos de los dos sistemas en las figuras 23 y 24. Por razones de comparación, se incluyen las versiones centrifugadas de las muestras.

Ejemplo 3

Evaluación *in vitro* del efecto protector de extracto sin células de *T. chuii* contra en células NHDF

Materiales y Métodos

Extracto: Extracto sin células de *T. chuii* (obtenido como se describe en el ejemplo 1)

Ensayo de toxicidad *in vitro*

Se obtuvieron fibroblastos dérmicos humanos primarios (NHDF) aislados de piel adulta humana normal de Lonza Clonetics™ (Lonza Walkersville, EE UU). Las células se cultivaron a 37ºC en una atmósfera de CO_2 al 5%, usando el medio recomendado FGM™-2 BulletKit™ que contenía suero al 2%. Para la evaluación del efecto protector del extracto sin células de *T. chuii* contra daño oxidativo provocado por H_2O_2, las células NHDF se preincubaron durante 48 horas en el medio de cultivo que contenía extracto sin células de *T. chuii* (obtenido como se describe en el ejemplo 1) a una concentración final de 300 µg/ml (p/v). Antes del tratamiento con H_2O_2 las células se lavaron dos veces con PBS 1x (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 2 mM), para prevenir interacciones extracelulares directas entre los compuestos del extracto y H_2O_2. Por último, se añadió H_2O_2 en el medio a una concentración final de 0,5 nM, y las células se incubaron a 37ºC durante 3 horas. Se evaluó la citotoxicidad determinando los niveles de ATP usando el kit ATP Vialight plus (Lonza Walkersville, EE UU) según el protocolo estándar del fabricante.

Resultados

El efecto protector del extracto sin células de *T. chuii* contra daño oxidativo provocado por H_2O_2 se estudió usando ensayos de toxicidad *in vitro* en fibroblastos dérmicos humanos primarios (NHDF). Las células NHDF se preincubaron durante 48 horas en el medio de cultivo que contenía *T. chuii* y el estrés oxidativo se provocó por la adición de H_2O_2 0,5 nM. Para estimar la citotoxicidad, las células NHDF también se trataron con H_2O_2 sin la adición previa de extracto sin células de *T. chuii*, mientras que células NHDF sin tratar se usaron como control. La citotoxicidad se evaluó determinando los niveles celulares de ATP (figura 25). Este análisis reveló que el pretratamiento de las células NHDF con el extracto sin células de *T. chuii* produjo la protección significativa de la viabilidad celular comparado con las células expuestas a H_2O_2 sin la adición previa del extracto. Por tanto, el extracto sin células de *T. chuii* protege eficazmente fibroblastos de piel primarios humanos contra estrés oxidativo causado por H_2O_2.

REIVINDICACIONES

1. Un método para obtener una biomasa de una microalga de la especie *Tetraselmis chuii* enriquecida en superóxido dismutasa (SOD) que comprende cultivar dicha microalga con estrés abiótico, en donde dicho estrés abiótico se selecciona del grupo que consiste en un potencial redox de al menos 200 mV en el medio de cultivo, y una concentración de nitrato en el medio de cultivo de menos de 1 µM.

2. Un método para enriquecer una biomasa de una microalga de la especie *Tetraselmis chuii* en superóxido dismutasa (SOD) que comprende cultivar dicha microalga con estrés abiótico, en donde el estrés abiótico se selecciona del grupo que consiste en un potencial redox de al menos 200 mV en el medio de cultivo y una concentración de nitrato en el medio de cultivo de menos de 1 µM.

3. Una biomasa de una microalga de la especie *T. chuii* enriquecida en SOD obtenida por el método según la reivindicación 1 o una biomasa de una microalga de la especie *T. chuii* enriquecida en SOD por el método según la reivindicación 2.

4. La biomasa según la reivindicación 3 que está deshidratada o tratada con salmuera.

5. Un método para la obtención de un extracto de proteína enriquecido en SOD de la biomasa de una microalga de la especie *T. chuii* según cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, que comprende las etapas de

a) homogenizar dicha biomasa de una microalga de la especie *T. chuii* obteniendo de esta manera un homogenizado, y
b) fraccionar el homogenizado obtenido en la etapa (i) por un sistema de partición bifásico acuoso de polietilenglicol/fosfato (PEG/Pi), obteniendo de esta manera un extracto de proteína enriquecido en SOD en la fracción acuosa de fosfato, en donde el sistema de partición bifásico acuoso de polietilenglicol/fosfato (PEG/Pi) se selecciona de los sistemas compuestos de:

- el 12 % en p/p de polietilenglicol que tiene un peso molecular promedio de 1500 Da y el 20 % de fosfato suplementado con el 10 % en p/p de NaCl y
- el 12 % en p/p de polietilenglicol que tiene un peso molecular promedio de 3000 Da y el 20 % en p/p de fosfato suplementado con el 3,5 % en p/p de NaCl.

6. Un extracto de proteína enriquecido en SOD obtenido mediante el método según la reivindicación 5.

7. Un producto alimenticio o una composición farmacéutica que comprende la biomasa de una microalga de la especie *T. chuii* enriquecida en SOD según la reivindicación 3, o la biomasa deshidratada o tratada con salmuera de una microalga de la especie *T. chuii* enriquecida en SOD según la reivindicación 4, o el extracto de proteína enriquecido en SOD según la reivindicación 6.

8. El uso de la biomasa de una microalga de la especie *T. chuii* enriquecida en SOD según la reivindicación 3, o la biomasa de una microalga de la especie *T. chuii* deshidratada o tratada con salmuera enriquecida en SOD según la reivindicación 4, o el extracto de proteína enriquecido en SOD según la reivindicación 6, como un cosmético o como un antioxidante.

9. Biomasa de una microalga de la especie *T. chuii* enriquecida en SOD según la reivindicación 3, o la biomasa de una microalga de la especie *T. chuii* deshidratada o tratada con salmuera enriquecida en SOD según la reivindicación 4, el extracto de proteína enriquecido en SOD según la reivindicación 6 para su uso en medicina.

10. Biomasa de una microalga de la especie *T. chuii* enriquecida en SOD según la reivindicación 3, o la biomasa de una microalga de la especie *T. chuii* deshidratada o tratada con salmuera enriquecida en SOD según la reivindicación 4, o el extracto de proteína enriquecido en SOD según la reivindicación 6, o la composición farmacéutica según la reivindicación 7 para su uso en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad o afección caracterizada por un estrés oxidativo y/o una actividad inflamatoria, o en mejorar la tolerancia a radioterapia.

11. Uso de una salmuera que comprende entre 10 y 18 g/l de azufre total (S), entre 40 y 55 g/l de sulfato (SO_4^{2-}), entre 60 y 1.500 mg/l de calcio (Ca^{2+}), entre 52 y 70 g/l de magnesio (Mg^{2+}), entre 15 y 20 g/l de potasio (K^+), entre 9 y 20 g/l de potasio (Na^+); entre 115 y 180 g/l de cloruro (Cl^-), y que tiene una densidad entre 1,25 y 1,30 g/ml a 20ºC como un estabilizante de SOD comprendida en una biomasa de una microalga que contiene SOD, en donde dicha biomasa es la biomasa de una microalga de la especie *T. chuii* enriquecida en SOD según la reivindicación 3.

12. Una biomasa de una microalga de la especie *T. chuii* enriquecida en SOD caracterizada en que SOD está estabilizada con una salmuera, en donde la salmuera comprende entre 10 y 18 g/l de azufre total (S), entre 40 y 55 g/l de sulfato (SO_4^{2-}), entre 60 y 1.500 mg/l de calcio (Ca^{2+}), y entre 52 y 70 g/l de magnesio (Mg^{2+}), y entre 15 y 20 g/l de potasio (K^+), y entre 9 y 20 g/l de potasio (Na^+); y entre 115 y 180 g/l de cloruro (Cl^-), y que tiene una densidad entre 1,25 y 1,30 g/ml a 20ºC, en donde dicha biomasa es la biomasa de una microalga de la especie *T. chuii* enriquecida

en SOD según la reivindicación 3.

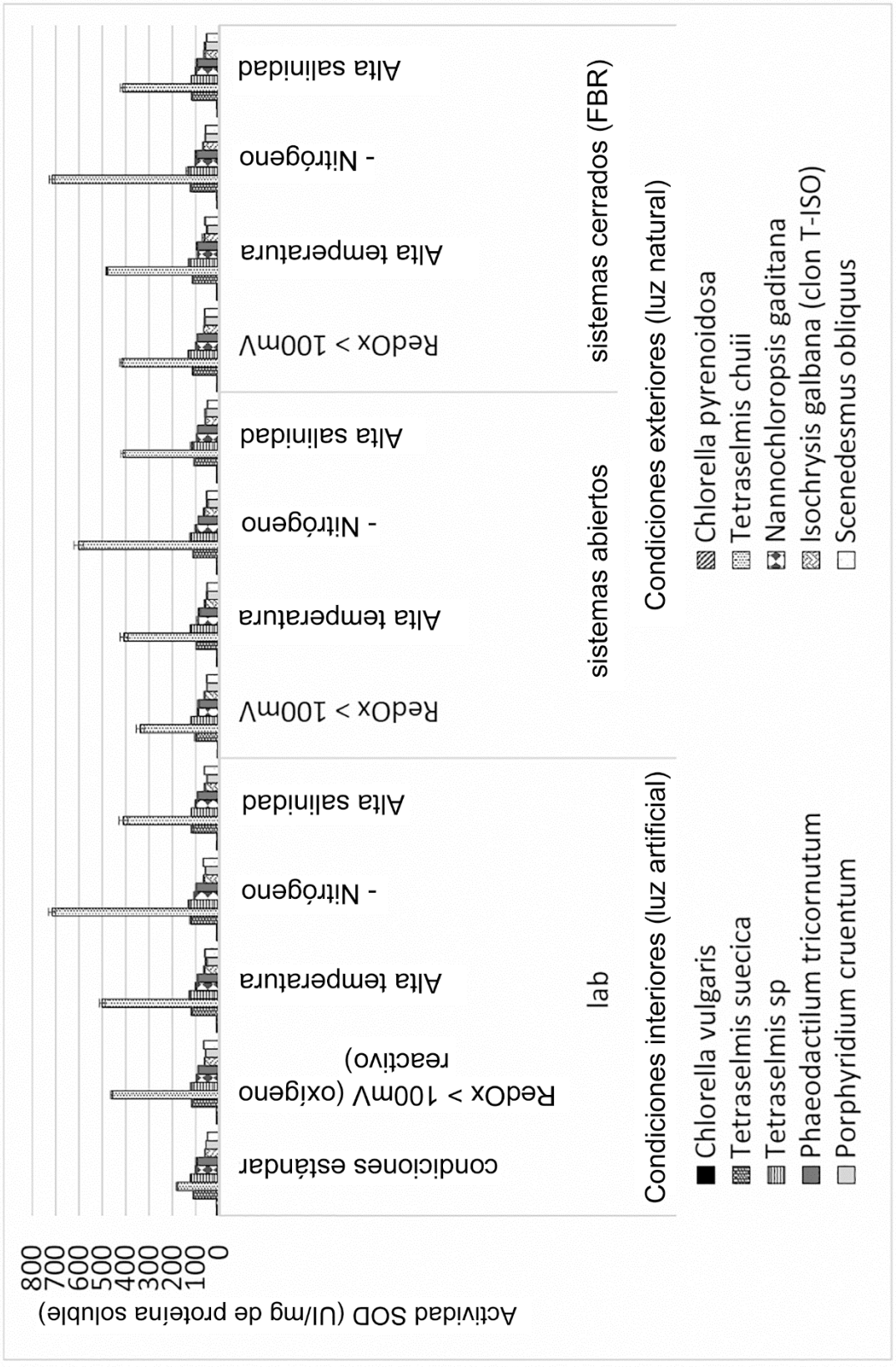
Actividad SOD (Ul/mg de proteína soluble)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
condiciones estándar
RedOx > 100mV (oxígeno reactivo)
Alta temperatura
- Nitrógeno
Alta salinidad
RedOx > 100mV
Alta temperatura
- Nitrógeno
Alta salinidad
RedOx > 100mV
Alta temperatura
- Nitrógeno
Alta salinidad
lab
sistemas abiertos
sistemas cerrados (FBR)
Condiciones interiores (luz artificial)
Condiciones exteriores (luz natural)
Chlorella vulgaris
Tetraselmis suecica
Tetraselmis sp
Phaeodactilum tricornutum
Porphyridium cruentum
Chlorella pyrenoidosa
Tetraselmis chuii
Nannochloropsis gaditana
Isochrysis galbana (clon T-ISO)
Scenedesmus obliquus

Fig. 1

Diseño experimental

Ejecuciones	% de PEG p/p	% de Pi p/p	PEG (g)	Pi (g)	Muestra	ddH_2O	Peso total
1	15	17	0,3	0,43	0,1	0,17	1
2	20	12	0,4	0,3	0,1	0,2	1
3	12	17	0,24	0,43	0,1	0,23	1
4	19	15	0,38	0,38	0,1	0,14	1
5	16	11	0,32	0,28	0,1	0,3	1
6	16	19	0,32	0,48	0,1	0,1	1
7	18	16	0,36	0,4	0,1	0,14	1
8	11	18	0,22	0,45	0,1	0,23	1
9	17	15	0,34	0,38	0,1	0,18	1
10	12	20	0,24	0,5	0,1	0,16	1
11	18	12	0,36	0,3	0,1	0,24	1
12	15	20	0,3	0,5	0,1	0,1	1
13	11	13	0,22	0,33	0,1	0,35	1
14	13	18	0,26	0,45	0,1	0,19	1
15	17	14	0,34	0,35	0,1	0,21	1
16	20	14	0,4	0,35	0,1	0,15	1
17	14	19	0,28	0,48	0,1	0,14	1
18	13	11	0,26	0,28	0,1	0,36	1
19	19	13	0,38	0,33	0,1	0,19	1
20	14	16	0,28	0,4	0,1	0,22	1

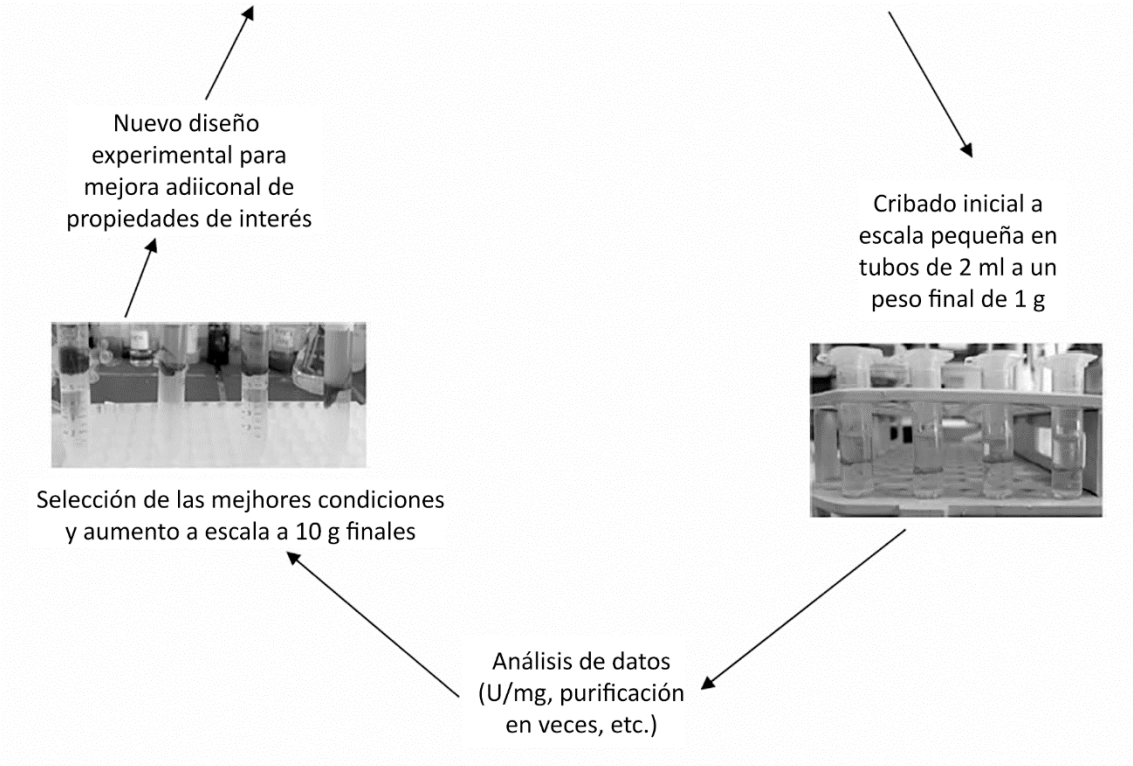

Fig. 2

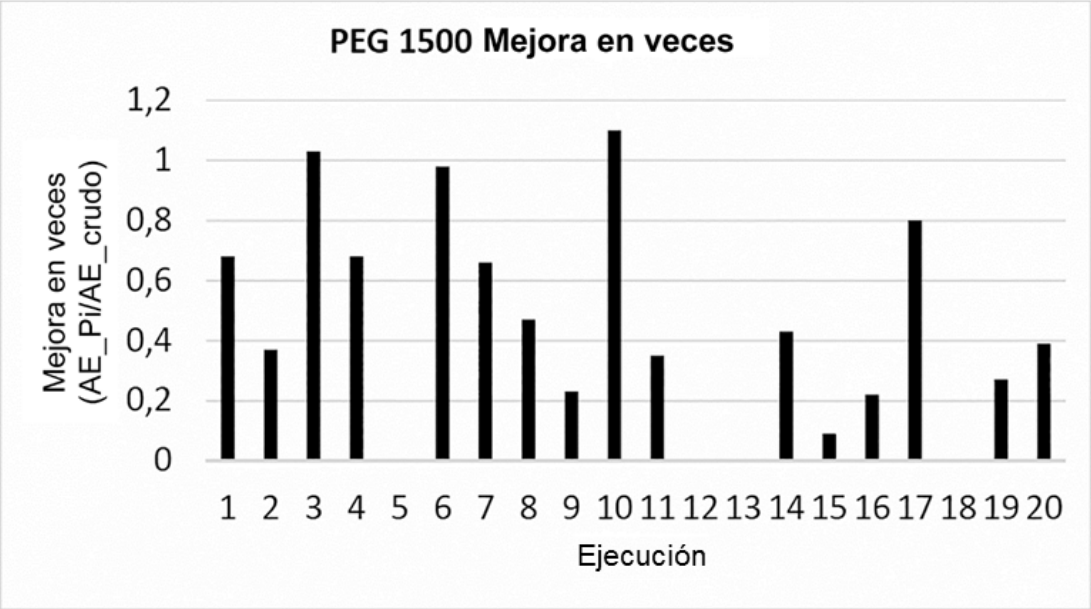
PEG 1500 Mejora en veces
Mejora en veces (AE_Pi/AE_crudo)
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
Ejecución

Fig. 3

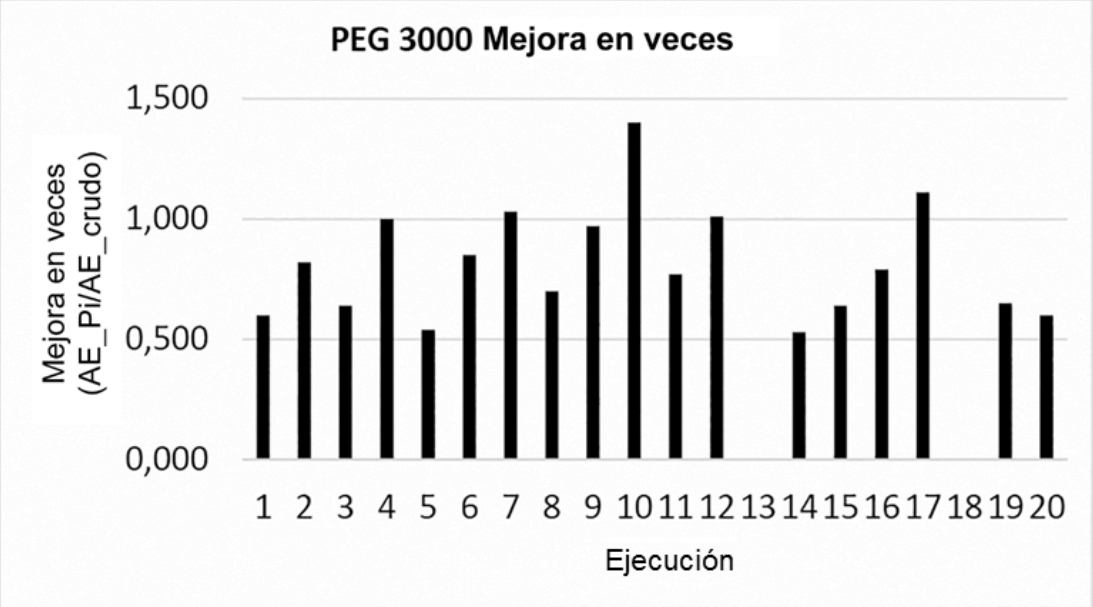
PEG 3000 Mejora en veces
Mejora en veces (AE_Pi/AE_crudo)
1,500
1,000
0,500
0,000
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
Ejecución

Fig. 4

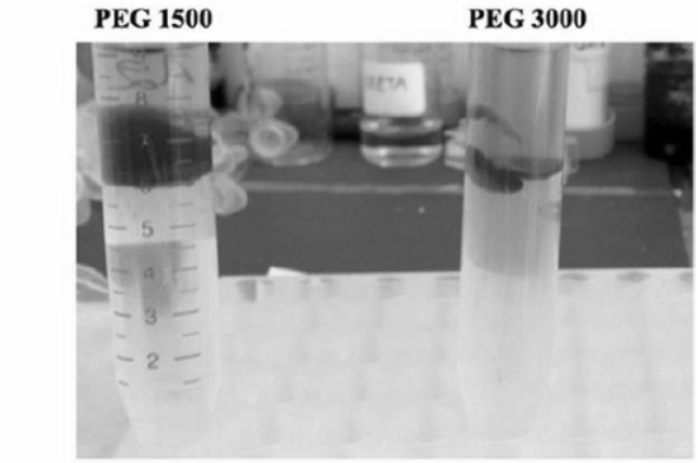
PEG 1500
PEG 3000

Fig. 5

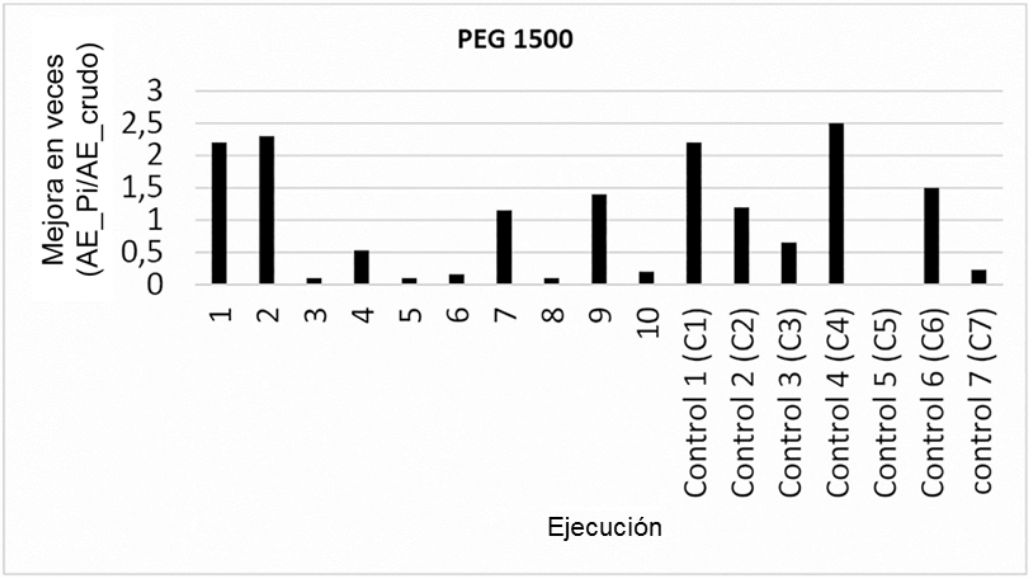
PEG 1500
Mejora en veces (AE_Pi/AE_crudo)
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
Control 1 (C1)
Control 2 (C2)
Control 3 (C3)
Control 4 (C4)
Control 5 (C5)
Control 6 (C6)
control 7 (C7)
Ejecución

Fig. 6

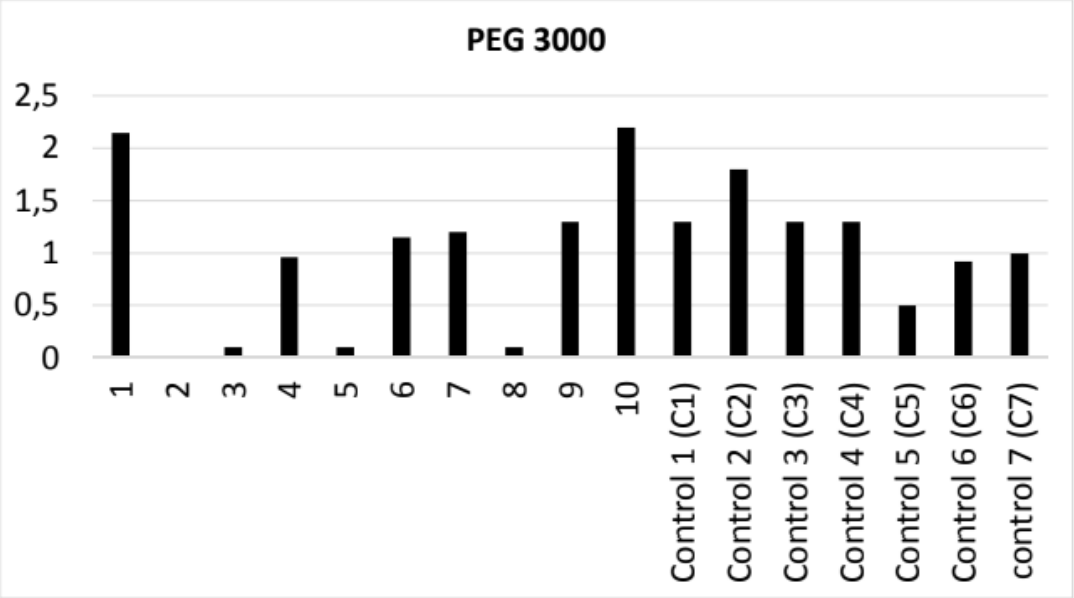
PEG 3000
2,5
2
1,5
1
0,5
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
Control 1 (C1)
Control 2 (C2)
Control 3 (C3)
Control 4 (C4)
Control 5 (C5)
Control 6 (C6)
control 7 (C7)

Fig. 7

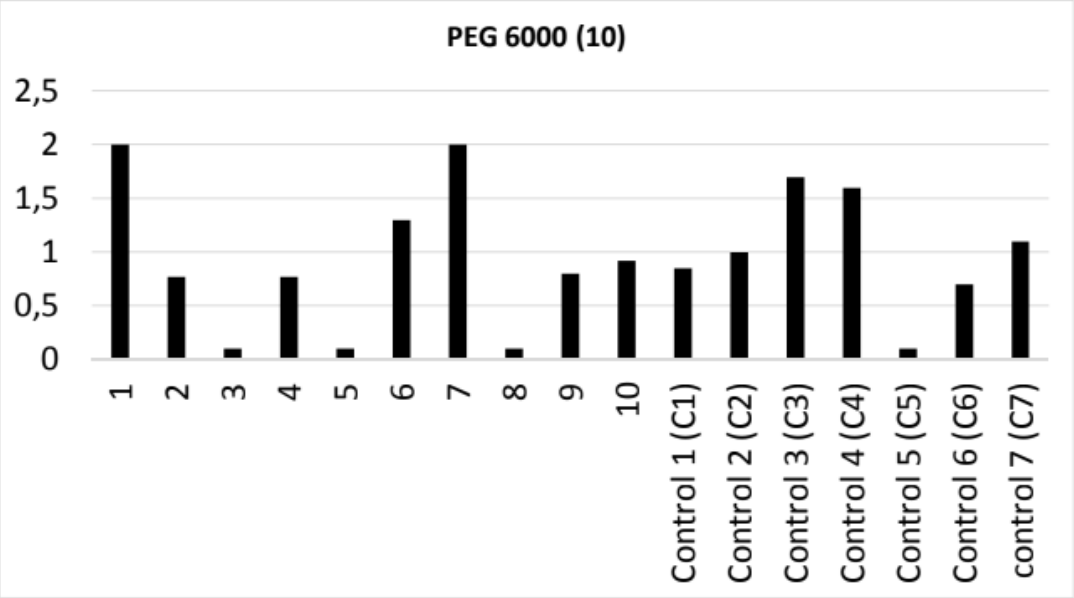
PEG 6000 (10)
2,5
2
1,5
1
0,5
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
Control 1 (C1)
Control 2 (C2)
Control 3 (C3)
Control 4 (C4)
Control 5 (C5)
Control 6 (C6)
control 7 (C7)

Fig. 8

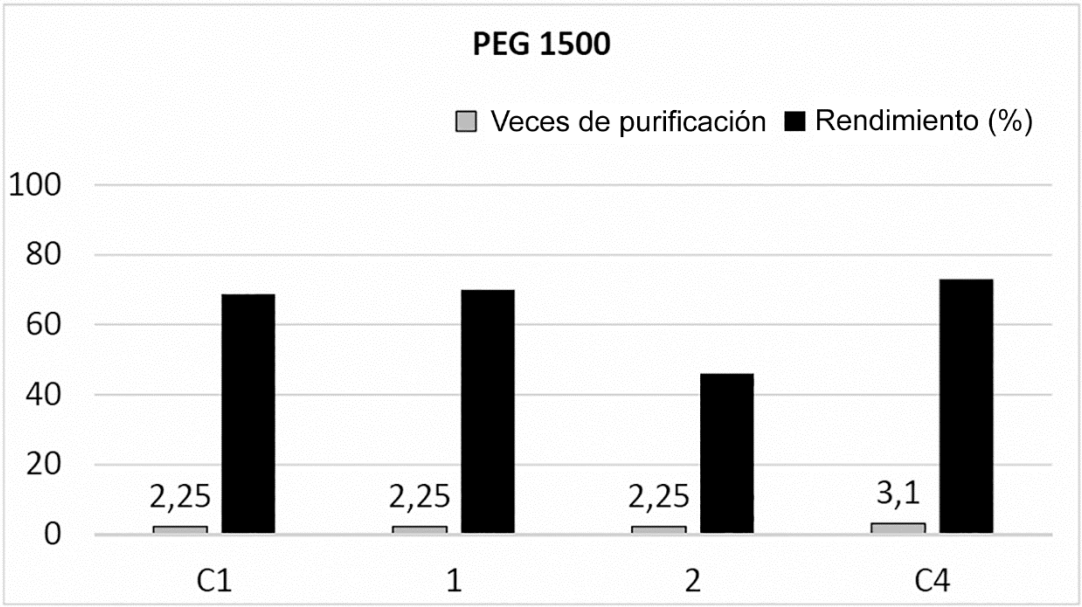
PEG 1500
Veces de purificación
Rendimiento (%)
100
80
60
40
20
0
2,25
2,25
2,25
3,1
C1
1
2
C4

Fig. 9

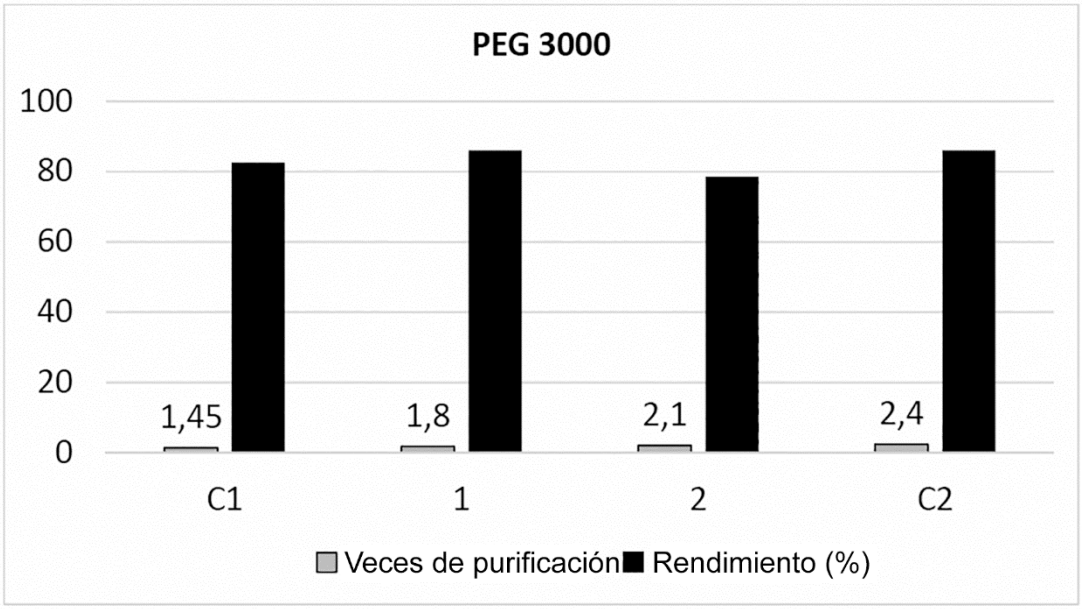
PEG 3000
100
80
60
40
20
0
1,45
1,8
2,1
2,4
C1
1
2
C2
Veces de purificación
Rendimiento (%)

Fig. 10

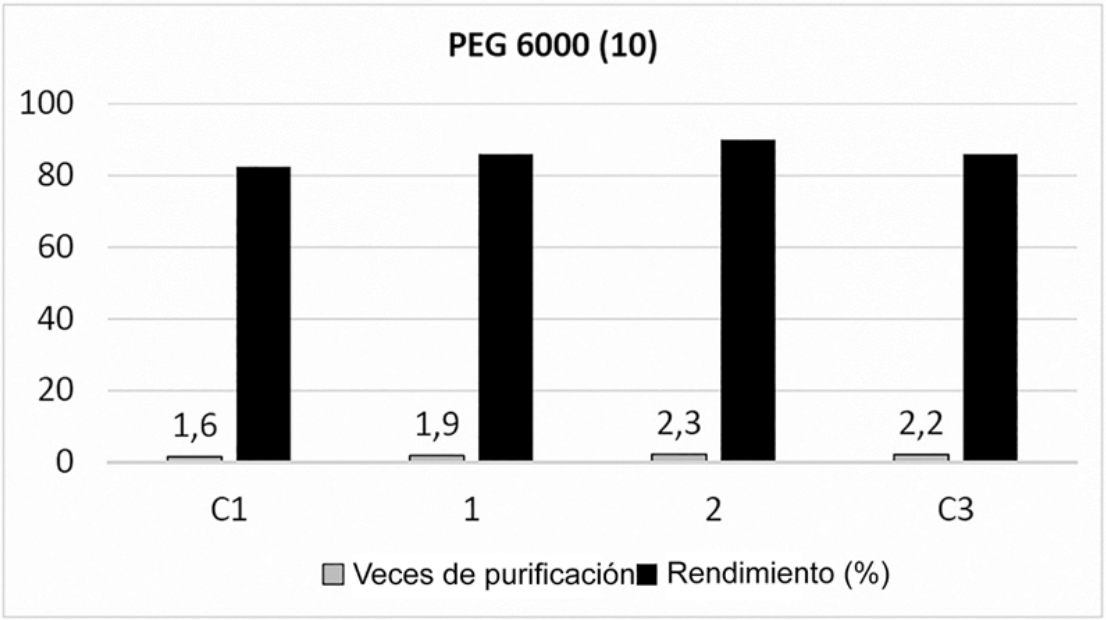
PEG 6000 (10)
100
80
60
40
20
0
1,6
1,9
2,3
2,2
C1
1
2
C3
Veces de purificación
Rendimiento (%)

Fig. 11

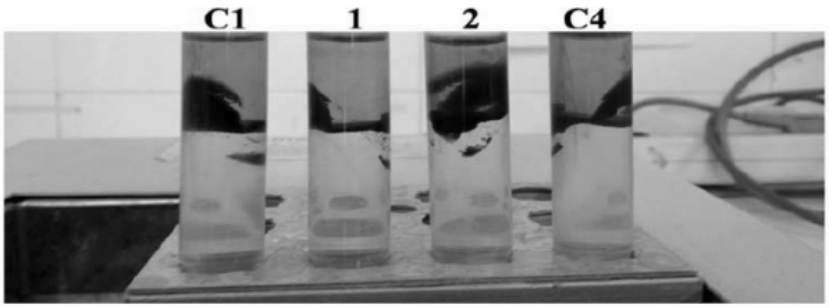
C1
1
2
C4

Fig. 12

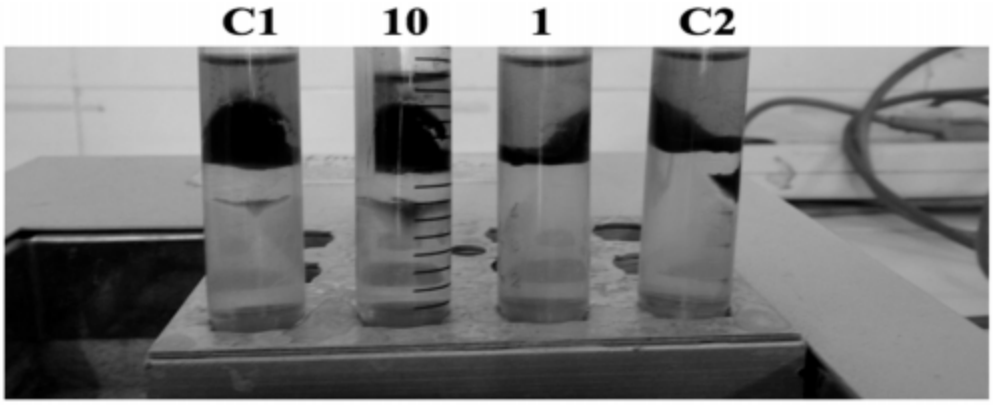

Fig. 13

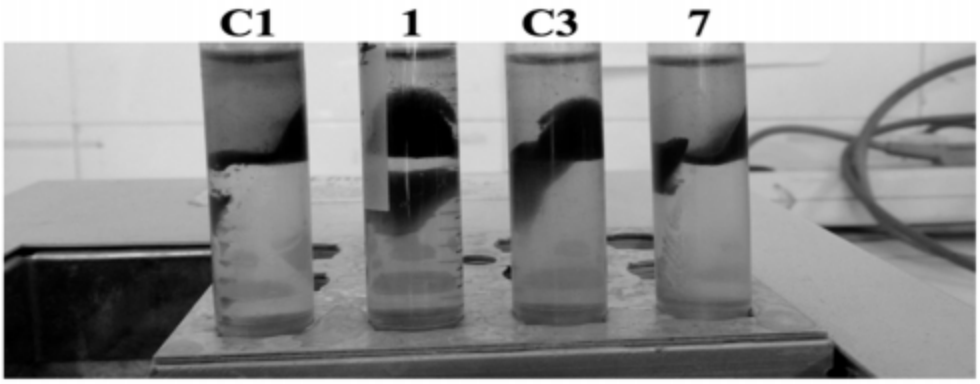

Fig. 14

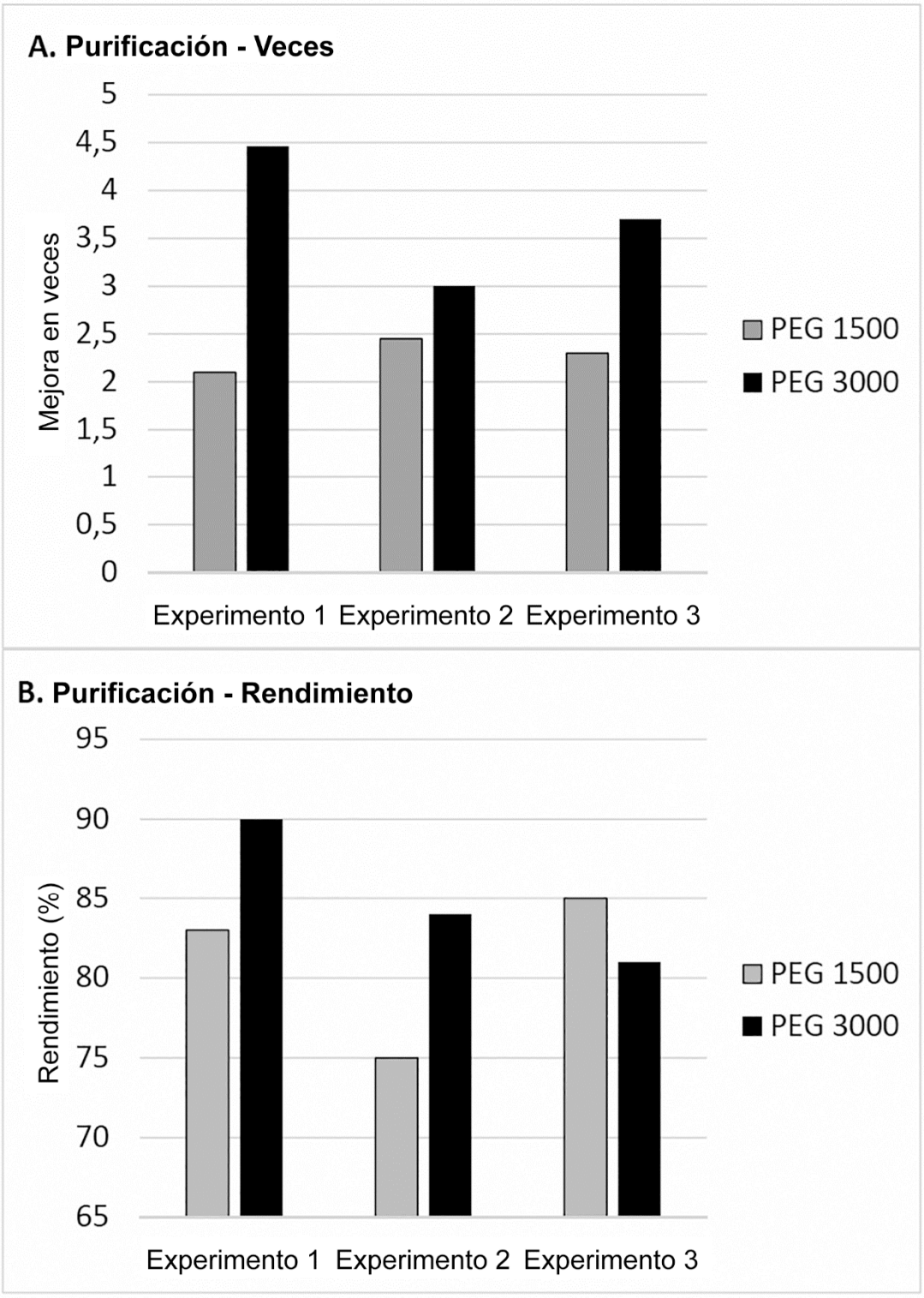
A. Purificación - Veces
Mejora en veces
5
4,5
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
Experimento 1
Experimento 2
Experimento 3
PEG 1500
PEG 3000
B. Purificación - Rendimiento
Rendimiento (%)
95
90
85
80
75
70
65
Experimento 1
Experimento 2
Experimento 3
PEG 1500
PEG 3000

Fig. 15

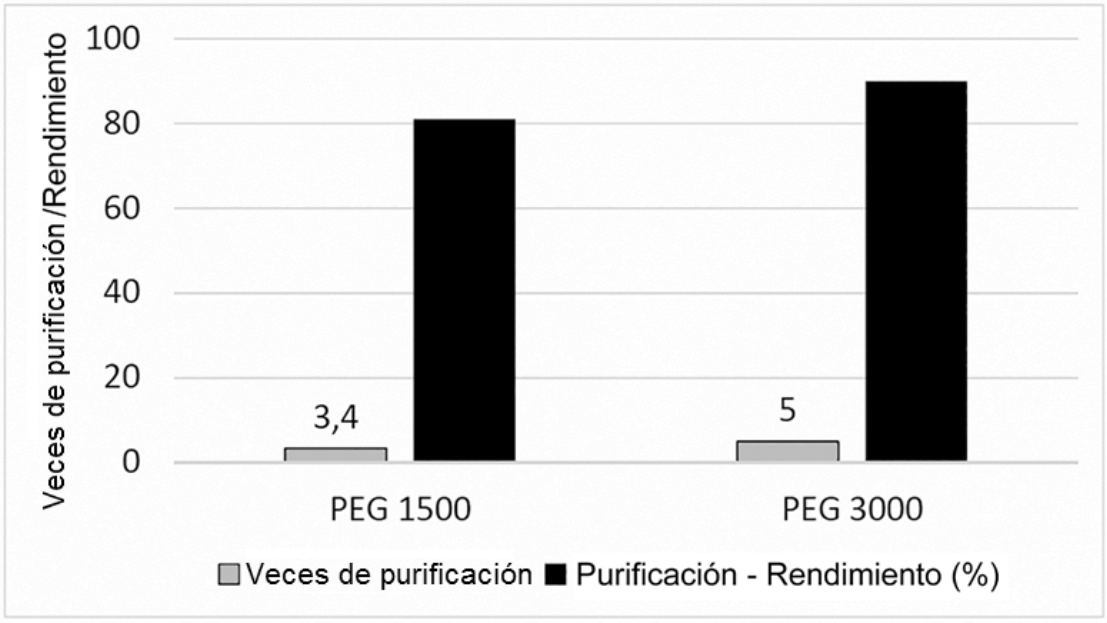
Veces de purificación /Rendimiento
100
80
60
40
20
0
3,4
5
PEG 1500
PEG 3000
Veces de purificación
Purificación - Rendimiento (%)

Fig. 16

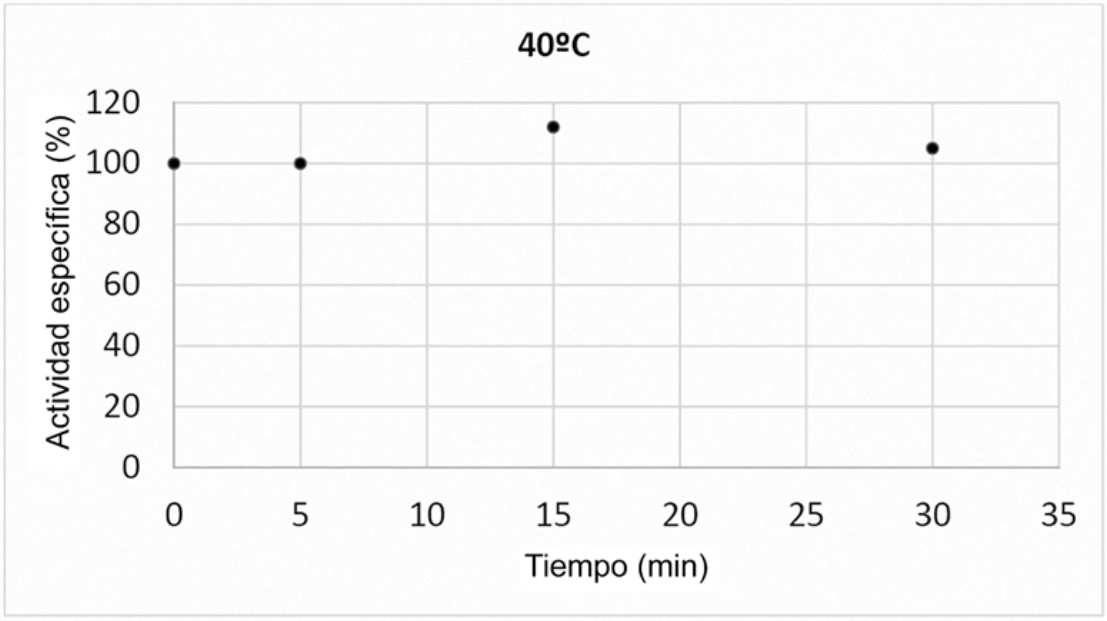
40ºC
Actividad especifica (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
25
30
35
Tiempo (min)

Fig. 17

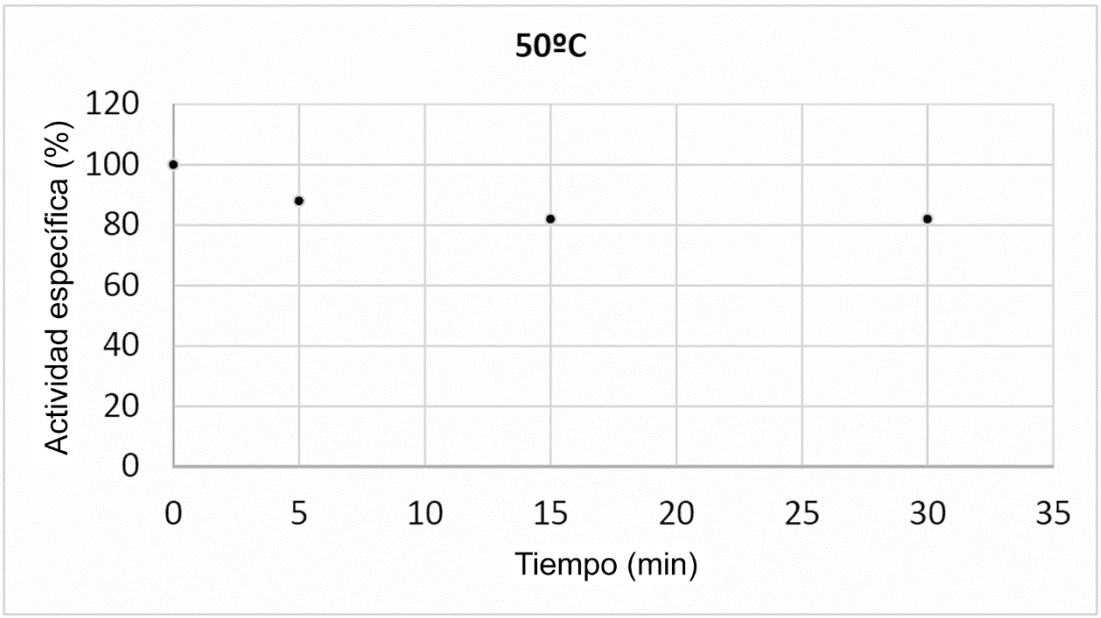
50ºC
Actividad específica (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
25
30
35
Tiempo (min)

Fig. 18

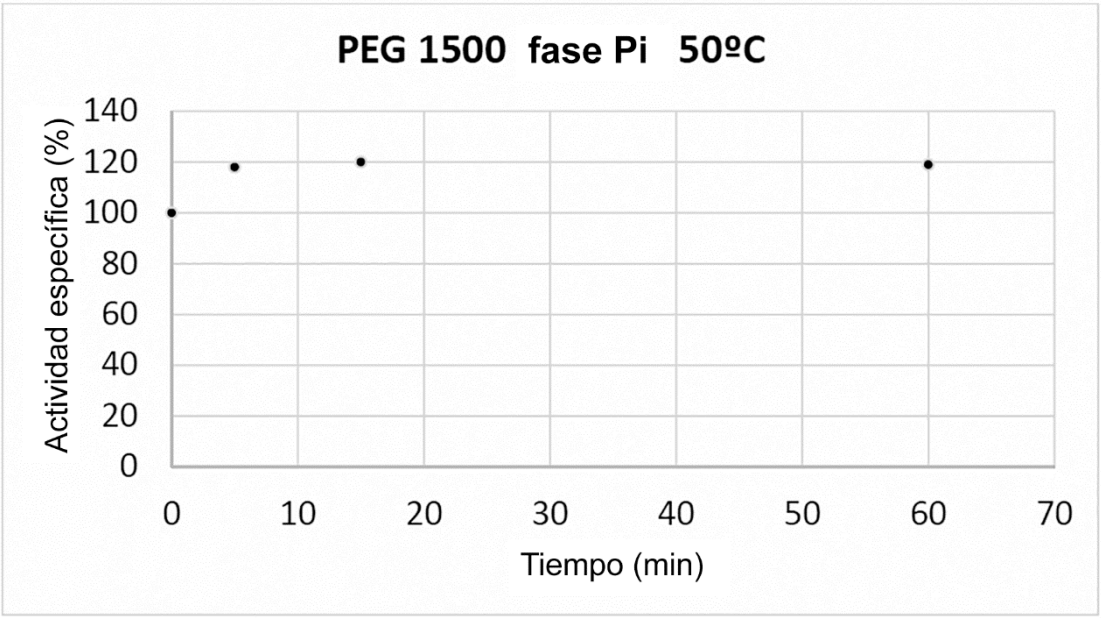
PEG 1500 fase Pi 50ºC
Actividad específica (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
60
70
Tiempo (min)

Fig. 19

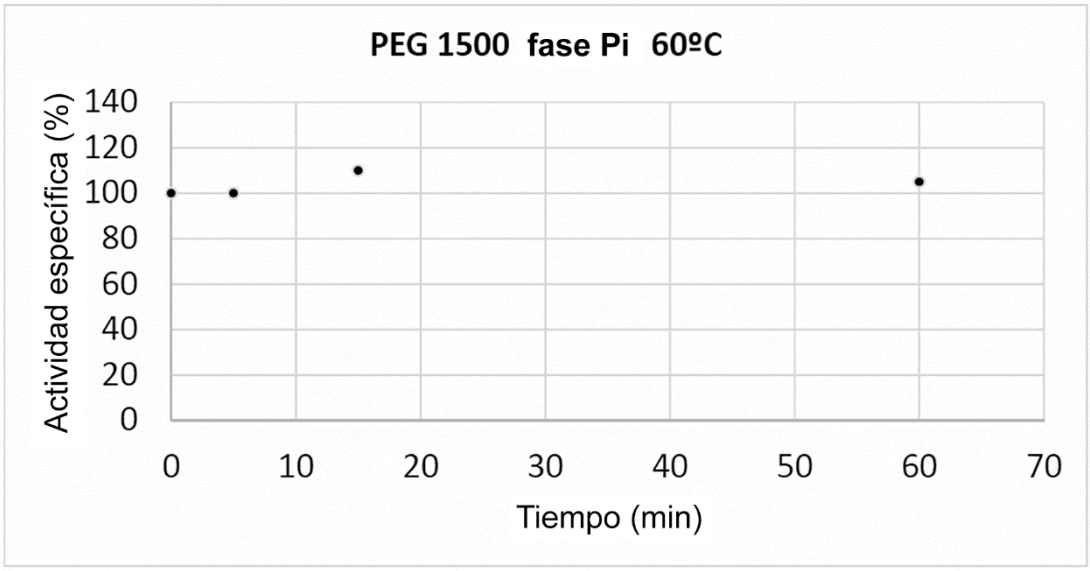
PEG 1500 fase Pi 60ºC
Actividad específica (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
60
70
Tiempo (min)

Fig. 20

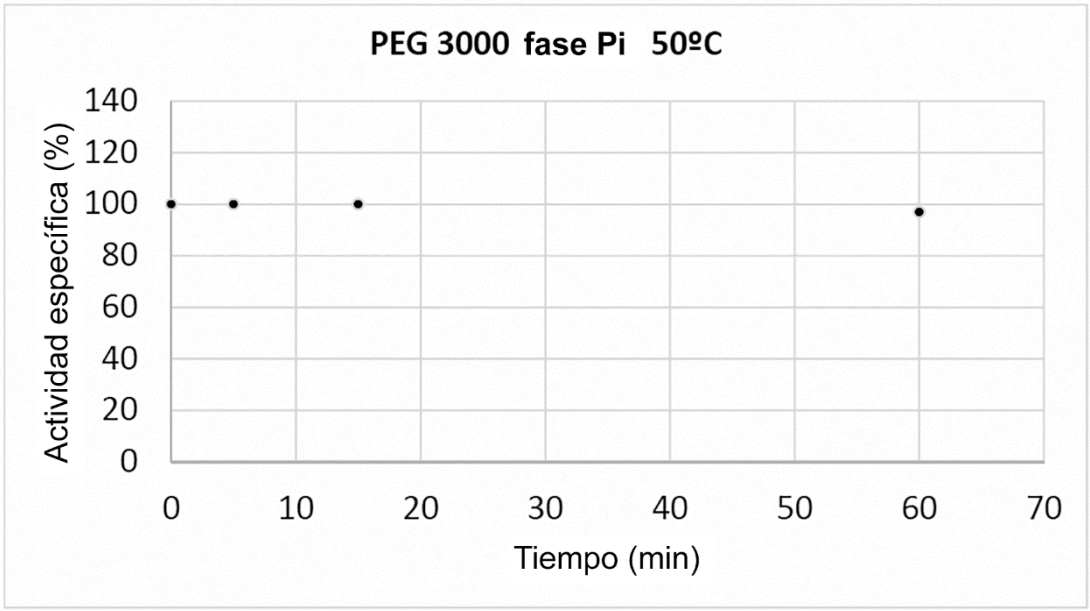
PEG 3000 fase Pi 50ºC
Actividad específica (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
60
70
Tiempo (min)

Fig. 21

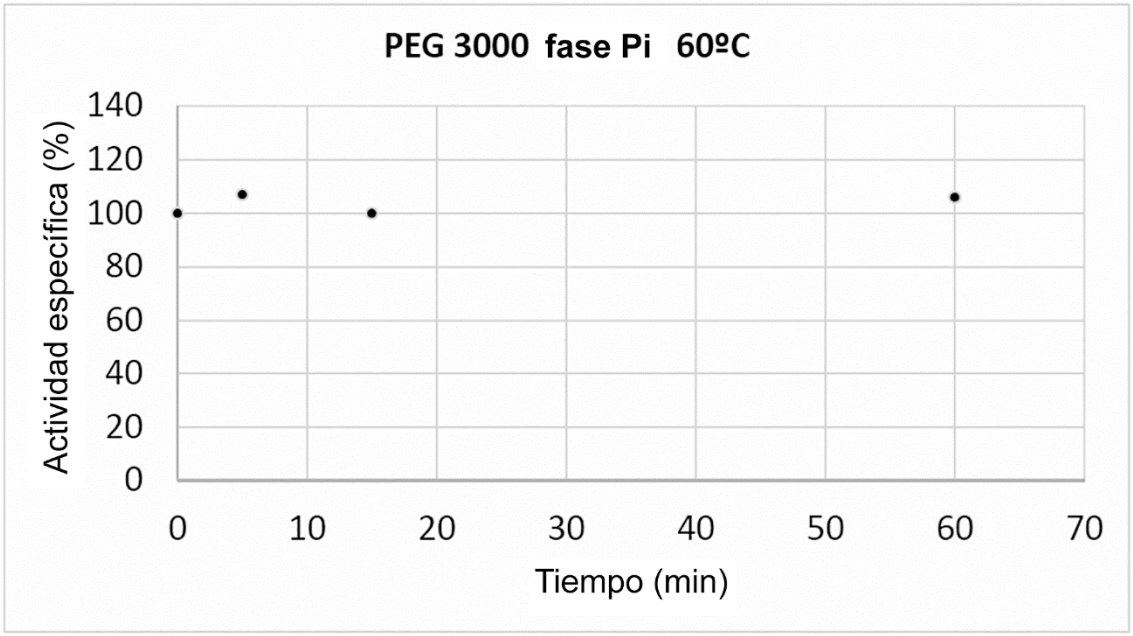
PEG 3000 fase Pi 60ºC
Actividad específica (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
60
70
Tiempo (min)

Fig. 22

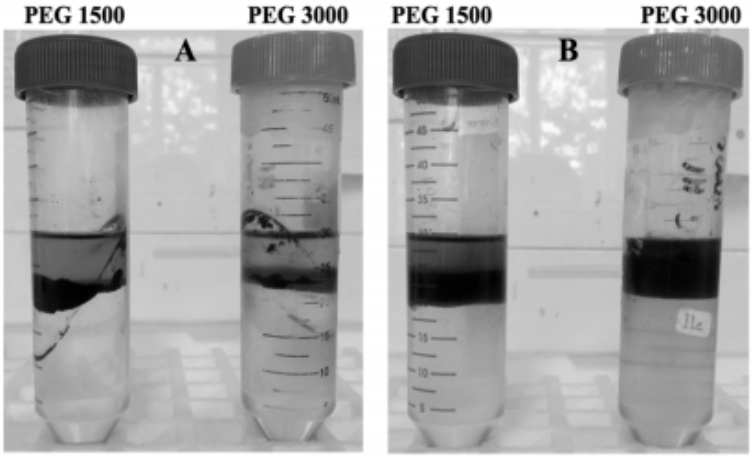
PEG 1500
PEG 3000
A
PEG 1500
PEG 3000
B

Fig. 23

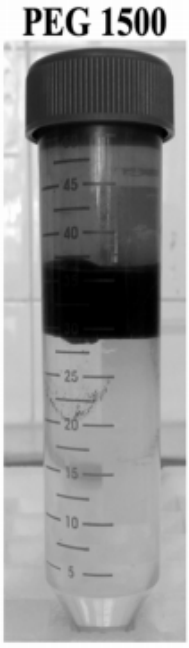
PEG 1500
45
40
25
20
15
10
5

Fig. 24

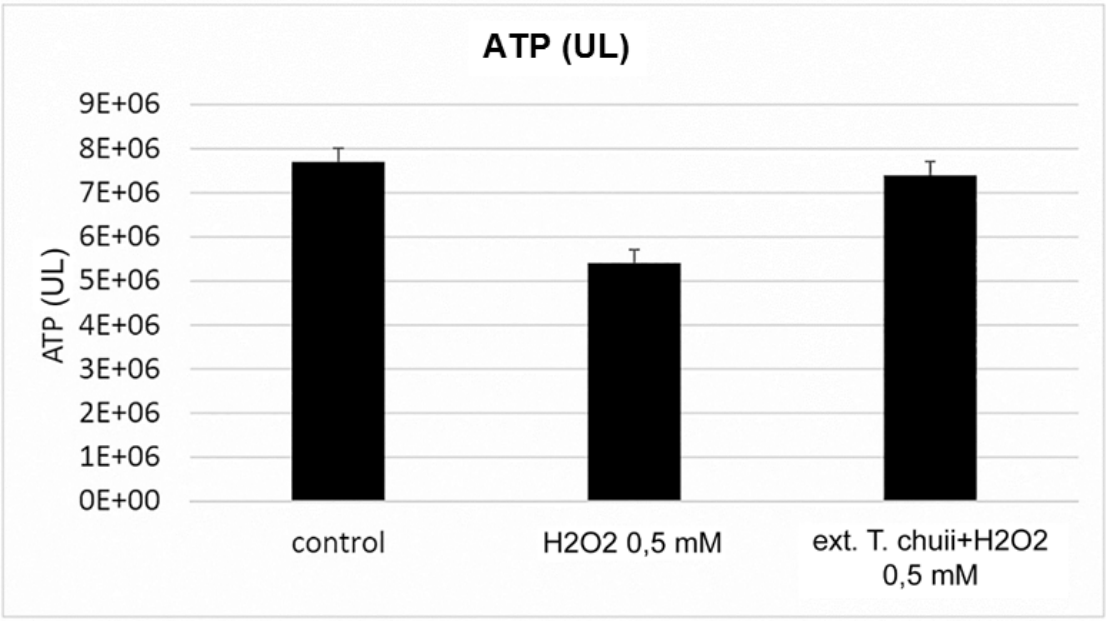
ATP (UL)
9E+06
8E+06
7E+06
6E+06
5E+06
4E+06
3E+06
2E+06
1E+06
0E+00
ATP (UL)
control
H2O2 0,5 mM
ext. T. chuii+H2O2 0,5 mM

Fig. 25