



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 N.º de publicación: **ES 2 088 366**

21 Número de solicitud: 9500053

51 Int. Cl.⁶: C12N 1/12

C12P 7/64

A23K 1/18

//(C12P 7/64

C12R 1:89)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **13.01.95**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **01.08.96**

Fecha de concesión: **17.01.97**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **01.03.97**

45 Fecha de publicación del folleto de patente:
01.03.97

73 Titular/es: **Universidad de Almería
Ctra. de Sacramento, s/n
04120 Almería, ES**

72 Inventor/es: **López Alonso, Diego;
Sánchez Pérez, José A.;
García Sánchez, José L.;
García Camacho, Francisco y
Molina Grima, Emilio**

74 Agente: **Fernández Marquina, Pilar**

54 Título: **Microalga marina y su empleo en acuicultura y en la obtención de ácidos grasos poliinsaturados.**

57 Resumen:

Microalga marina y su empleo en acuicultura y en la obtención de ácidos grasos poliinsaturados. Una cepa de la microalga marina *Isochrysis galbana*, depositada en la CCAP con el número de depósito CCAP 927/15 es capaz de producir elevadas cantidades de ácidos grasos poliinsaturados, especialmente de ácido eicosapentaenoico (EPA) y de ácido docosahexaenoico (DHA). La cepa microalgal crece adecuadamente a una temperatura de 18 °C a 25 °C, en un pH de 7 a 9,5, preferentemente a un pH de 7,65 a 8,00. La cepa microalgal, cultivada a 20 °C en un fermentador de 5 litros agitado por paletas y con iluminación continua, produce EPA en una cantidad de, al menos, 39,5 mg por gramo de materia seca. Esta cepa es adecuada para su empleo en acuicultura (alimentación de larvas de peces y moluscos) y en la obtención de EPA y/o de un aceite rico en EPA y en DHA necesarios para la nutrición y salud humanas.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 - 28036 Madrid

ES 2 088 366 B1

DESCRIPCION

Microalga marina y su empleo en acuicultura y en la obtención de ácidos grasos poliinsaturados.

Campo de la invención

Esta invención se refiere a una cepa de una microalga marina productora de ácido eicosapentaenoico (EPA) y de ácido docosahexaenoico (DHA) y a su empleo en acuicultura y en la obtención de EPA y/o de un aceite rico en EPA y en DHA.

Antecedentes de la invención

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de cadena larga son interesantes por su importancia en la acuicultura y por su relación con la salud humana.

Dentro de los PUFA, son particularmente importantes los miembros de cadena larga de la familia ω -3 o n-3, en especial, el ácido eicosapentaenoico (20:5n3), en adelante EPA, y el ácido docosahexaenoico (22:6n3), en adelante DHA. que proceden de la desaturación y elongación del ácido oleico (18:1n9), gracias a la intervención de las enzimas relacionadas (Δ -desaturasas y elongasas) [Yongmanitchai, W. y Ward, O.P., *Process Biochemistry*, 117-125 (1989); Bajpai, P. y Bajpai, P.K., *Journal of Biotechnology*, 30:161-183 (1993); Kennedy et al., *Biotechnology and Bioengineering*, 42:625-634 (1993); Ratledge, C., *Tibtech*, 11:278-284 (1993)].

En relación con la acuicultura se sabe que los PUFA son componentes esenciales en la nutrición de moluscos bivalvos y peces, habiéndose demostrado que el desarrollo adecuado y la capacidad de supervivencia de los moluscos bivalvos y de las fases tempranas de los peces depende de una dieta rica en EPA y en DHA [Aaronson et al., *Algae Biomass*, Shelef, G. and Soeder, C.J. (Editors), Northolland Biomedical Press, 575-601 (1980); Langdon, C.J. y Waldock, M.J., *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, 61:431-448 (1981); Whyte, J.N.C., *Aquaculture*, 60:231-241 (1987); Fernández-Reiriz et al., *Aquaculture*, 83:17-31 (1989)].

Respecto a su importancia para la salud humana, se ha demostrado su relación con la prevención y el tratamiento de arteriosclerosis, trombosis, artritis y algunos tipos de cáncer [Klausner, A., *Biotechnology*, 4:947-953 (1986); Yongmanitchai y Ward, 1989, *citado supra*; Sinopoulos, A.P., *Am. J. Clin. Nutr.*, 54:438-463 (1991); First European Congress on Microalgae and Health, Montpellier, Francia, Abril, 1993; Nettleton, J.A., *Perspectives in Practice*, 93:58-64 (1993); Iacono, J.M. y Dougherty, R.M., *Annu. Rev. Nutr.* 13:243-260 (1993)] a través de su interconversión metabólica en eicosanoides tales como prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos. Se conocen composiciones farmacéuticas que incorporan este tipo de ácidos en su formulación.

Farmacológicamente el EPA no tiene un efecto simple sino múltiple, fundamentalmente sobre varios aspectos relacionados con el sistema circulatorio. El conjunto de sus efectos pueden resumirse en dos efectos básicos de tipo preventivo:

- 1) contribuyendo a una disminución sustancial del riesgo de infarto de miocardio [Nelson, A.M., *Geriatrics*, 12:103-116 (1972)]

por medio de la acción combinada de los siguientes efectos:

- a) una acción contra la arteriosclerosis, debido a una reducción del nivel de colesterol LDL, y a una reducción del nivel de triglicéridos plasmáticos [Nelson, (1972), *citado supra*; Bronsgeest-Schoute, et al., *Am. J. Clin. Nutr.*, 34:175 (1981); Dyerberg, J., *Nutrition Reviews*, 44:125-134 (1986); Iacono y Dougherty, (1993) *citado supra*];
- b) una acción contra la trombosis, debido a una reducción de la velocidad sanguínea y de la agregación plaquetaria y a un incremento de la presencia de antitrombina [Nelson (1972); Bronsgeest-Schoute (1981); Dyerberg, (1986); Iacono y Dougherty, (1993), *citados supra*]; y
- c) disminuyendo la presión sanguínea, tanto sistólica como diastólica; y

- 2) ejerciendo una acción anticancerosa sobre algunos tipos concretos de cáncer.

El mecanismo molecular responsable de los efectos previamente citados no está perfectamente caracterizado en todos sus detalles. No obstante, se sabe que se ejerce a través de los eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos) [Dyerberg, (1986), *citado supra*; Singh, G. y Chandra, R.K., *Progress in Food and Nutrition Science*, 12:371-419 (1988); Ansoleaga, J.J y Coronas, R., *Monografías Médicas/Dietética y Nutrición*, 3, 135-140 (1989); Leaf, D.A., *Jano*, 49 (914):39-42 (1990)]. Asimismo, se ha demostrado un efecto directo sobre la expresión de los genes lipogénicos hepáticos, existiendo un elemento de respuesta al EPA en el ADN cercano al promotor de esos genes.

Por su parte, el DHA tiene un papel específico como lípido estructural ya que forma parte de las membranas y aparece en cantidades sustancialmente elevadas en el sistema nervioso central, en la retina, testículos y esperma [Singh y Chandra, (1988), *citado supra*]. La privación nutricional de DHA provoca disturbios neuronales, tales como visión borrosa, esclerosis múltiple y distrofia muscular, entre otros, [Singh y Chandra, (1988) *citado supra*; Innis, S.M., *Prog. Lipid. Res.*, 30:39-103 (1991)].

Se han sugerido múltiples papeles para el DHA en las membranas biológicas, principalmente en las interacciones lipo-proteicas con la acetil-colinesterasa y con la protein-kinasa C, entre otras, [Singh y Chandra, (1988), *citado supra*]. Aunque su función molecular exacta es desconocida, la información disponible demuestra que el DHA es crucial para el desarrollo de las funciones relacionadas con las membranas del sistema nervioso central [Innis, (1991) y Sinopoulos, (1991), *citados supra*]. En este sentido, el DHA es nutricionalmente imprescindible durante el desarrollo, antes y después del parto, cuando está formándose el sistema nervioso [Innis, (1991), *citado supra*; Arbuckle, L.D., e Innis, S.M., *Journal of Nutrition*, 123:1668-1675 (1993)], ya que en esos momentos un aporte inadecuado de DHA

provoca daños irreparables que no pueden ser recuperados posteriormente [Innis. (1991), *citado supra*].

Actualmente las únicas fuentes comerciales de EPA y DHA son los aceites de pescado de los que se extrae un concentrado lipídico rico en dichos PUFA. El empleo de aceites de pescado plantea diversos problemas ya que:

- a) despiden un olor desagradable por lo que resultan indeseables para muchas personas;
- b) la presencia de contaminantes en el medio marino, tales como pesticidas y metales pesados, ya que tienden a concentrarse en las grasas de los peces, convirtiéndose en un peligro potencial [Plakas, S.M., y Guarino, A.M., Proceedings of the Eleventh Annual Tropical and Subtropical Fisheries Conference of the Americas, 275-283 (1986)] que, inevitablemente, se convierte en un inconveniente a resolver durante el proceso de extracción;
- c) una producción sujeta a fluctuaciones impredecibles, tanto en el volumen de capturas como en la composición relativa de los peces de los que se extrae el aceite; y
- d) la objeción que por motivos religiosos o filosóficos pueden poner las personas vegetarianas que rechazan ingerir productos derivados de animales.

Asimismo, se ha estimado que la producción de EPA y DHA a partir del aceite de pescado es insuficiente para cubrir las necesidades crecientes del mercado, por lo que se han sugerido otras fuentes alternativas, tales como hongos, macroalgas y microalgas [Ben-Amotz et al., J. Phycol., 21:72-81 (1985); Iwamoto, H. y Sato, S., J. Am. Oil Chem. Soc., 63:434 (1986); Borowitzka, M.A., Microalgal Biotechnology, Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J. (Editors), Cambridge University Press, páginas 257-287 (1988); Yon-gmanitchai y Ward, (1989), *citado supra*; Yon-gmanitchai, W. y Ward, O.P., Phytochemistry, 30:2963-2967 (1991); López Alonso et al., Aquaculture, 102:363-371 (1992); López Alonso et al., Phytochemistry, 31(11): 3901-3904 (1992)].

El empleo de hongos como fuente alternativa de EPA presenta el inconveniente de la presencia de toxinas fúngicas que son difícilmente eliminables y que, en cualquier caso, suponen un coste adicional en el procesamiento de la biomasa para la obtención del aceite o del EPA puro. Por otra parte, los hongos son organismos heterótrofos para cuyo cultivo se requiere la adición de una fuente de carbono, lo que supone un encarecimiento del proceso de obtención de la biomasa.

Algunas macroalgas parecen ser ricas en EPA y no presentan los problemas mencionados con las otras fuentes. Sin embargo, su empleo presenta los problemas de que su cultivo en masa no está bien desarrollado, su lentitud de crecimiento respecto a los microorganismos y el requerimiento de instalaciones extensivas y costosas.

Por consiguiente, sigue existiendo la necesidad de disponer de una fuente de PUFA, especial-

mente de EPA y de DHA, que supere los inconvenientes y problemas previamente mencionados en relación con las fuentes actuales y alternativas.

En respuesta a los problemas previamente mencionados, la presente invención proporciona una cepa de una microalga marina productora de EPA y DHA que puede utilizarse tanto en acuicultura como para obtener EPA y/o un aceite rico en EPA y DHA.

Compendio de la invención

Esta invención proporciona una cepa de una microalga marina, perteneciente al género *Isochr-ysis*, que produce y contiene altas concentraciones de EPA y DHA, por lo que es adecuada para su empleo en:

- (a) la nutrición de moluscos bivalvos y de larvas de peces en instalaciones acuicultoras,
- (b) la extracción de un aceite rico en EPA y DHA susceptible de ser utilizado en nutrición humana y en pruebas clínicas, y
- (c) la extracción y purificación de EPA susceptible de ser utilizado en nutrición humana, en farmacología y en pruebas clínicas, para el tratamiento de diversas enfermedades.

Descripción detallada de la invención

La presente invención comprende, por una parte, el aislamiento y caracterización de la cepa de microalga marina productora de EPA y DHA en altas concentraciones, y por otra, su empleo en acuicultura y en la obtención de EPA y/o de un aceite rico en EPA y DHA. Todos estos aspectos se describirán con mayor detalle a continuación.

1. Cepa microalgal

1.1. Aislamiento de la cepa microalgal

Para el aislamiento de la cepa microalgal proporcionada por esta invención se ha seguido el método de "evaluación al azar y selección", que consiste, brevemente, en (a) cultivar diferentes cepas o clones de distintos microorganismos bajo condiciones adecuadas de nutrientes, luz, temperatura, pH y aporte de aire, (b) extraer los lípidos producidos por cada cepa, (c) analizar los lípidos extraídos para determinar su composición en ácidos grasos, y (d) seleccionar las cepas o clones que producían mayor cantidad de EPA y de DHA.

Para la determinación de los lípidos totales se adoptó el método propuesto por Richardson y col., que básicamente coincide con el descrito por Kochert [Kochert, G., en Physiological and Biochemical Methods, S.A. Hellebust y S.S. Craigie (Editors), Cambridge University Press (1978)].

Para la determinación de los ácidos grasos se ha utilizado el método de transesterificación directa descrito por Lepage y Roy [Lepage, G., y Roy, C.C., J. Lipid. Res. 25:1391-1396 (1984)], que no necesita separación previa de la fracción lipídica.

1.2. Caracterización de la cepa microalgal

La cepa que produjo mayor cantidad de EPA y de DHA resultó ser una cepa de un alga microscópica (microalga) marina, perteneciente al género *Isochr-ysis*, concretamente a la especie *Isochr-ysis galbana* Parke, de la Familia Isochrysidaceae, Orden Isochrysidales, Clase Prymnesiophyceae (=Haptophyceae), según se desprende de las

características morfológicas y fisiológicas que presenta.

1.2.1. *Características morfológicas*

Es un alga unicelular, con forma elipsoidal, y un tamaño entre 4 y 6 μm . Aparecen formas móviles, con dos flagelos, y formas inmóviles. Cuando se cultivan en medio sólido (agar), las colonias, de color amarillo-limón, aparecen constituidas por células in-móviles de un tamaño aproximadamente 10 veces menor que el de las formas normales en medio líquido.

A microscopía electrónica de transmisión, las células no presentan pared celular, y se observan, en algunos casos, los restos de una envoltura exterior posiblemente de naturaleza polisacárida. Las células presentan entre 1 y 3 cloroplastos periféricos con laminillas estromáticas que forman grana, y, frecuentemente, con granulaciones patentes menos refringentes; 2-3 mitocondrias de crestas tubulares; un núcleo con nucleolo fuertemente patente; aparato de Golgi en las cercanías del núcleo; retículo endoplasmático rugoso distribuido por todo el citoplasma; vacuolas más o menos abundantes según el estado fisiológico de la célula (más numerosas en cultivos privados de nutrientes) con un contenido que va desde transparente hasta levemente opaco a los electrones.

A microscopía electrónica de barrido, no se observa una envoltura externa con perfil geométrico regular sino una envoltura que va desde completamente lisa, a ligeramente mamelonada o con excrescencias, según la edad del cultivo. En los cultivos privados las células tienden a agruparse adhiriéndose unas a otras por la envoltura capsular.

1.2.2. *Características fisiológicas*

La cepa microalgal proporcionada por esta invención presenta las siguientes características fisiológicas:

- a) tiene una velocidad específica de crecimiento máxima en cultivos discontinuos de $0,032 \text{ h}^{-1}$, aunque dicha velocidad es superior en cultivos continuos ($0,038 \text{ h}^{-1}$);
- b) crece adecuadamente en un intervalo de temperatura comprendido entre 18°C y 25°C , si bien la temperatura óptima de crecimiento es de 20°C . A 30°C no crece aunque al volver a la temperatura óptima se reanuda el crecimiento;
- c) soporta un intervalo de pH amplio, de 7 a 9,5, aunque un pH de 7,65 a 8,00 es el pH óptimo para su crecimiento;
- d) requiere la adición de vitaminas, tales como biotina, tiamina y cianocobalamina, en muy bajas proporciones, para un desarrollo adecuado de los cultivos;
- e) cultivada a 20°C en un fermentador agitado por paletas y con iluminación continua, produce biomasa microalgal en una cantidad promedio de 0,5 g/l.d;
- f) cultivada a 20°C en un fermentador agitado por paletas y con iluminación continua, produce biomasa microalgal susceptible de ser utilizada para la extracción de un aceite con

un contenido de aproximadamente un 30% en peso, en EPA y de un 10% en peso, aproximadamente, en DHA;

- g) cultivada a 20°C en un fermentador agitado por paletas y con iluminación continua, produce EPA en una cantidad de, al menos, 39,5 mg por gramo de materia seca;
- h) cultivada a 20°C en un fermentador agitado por paletas y con iluminación continua, produce EPA en una cantidad media de, aproximadamente, 4,65 % sobre peso seco de biomasa;
- i) cultivada a 20°C en un fermentador agitado por paletas y con iluminación continua, produce DHA en una cantidad media de, aproximadamente, 1,42% sobre peso seco de biomasa.

1.2.3. *Ciclo vital*

Aunque no se conoce totalmente su ciclo vital, se ha podido averiguar que existen, al menos, tres tipos celulares, concretamente:

- (a) de pequeño tamaño (en agar),
- (b) de tamaño normal con flagelos, y
- (c) de tamaño normal sin flagelos.

Asimismo, existen evidencias indirectas de la existencia de reproducción sexual en algún estadio.

1.2.4. *Características de cultivo*

La cepa de la invención crece en un medio de cultivo líquido, tal como el constituido por el medio de Ukeles modificado [Ukeles, R., Biological Bulletin, 120:255-264 (1961)], al que se le agrega agua de mar filtrada a través de un filtro Millipore de 0,22 μm .

Asimismo, la cepa puede crecer en un medio de cultivo sólido que contiene el mismo medio de cultivo líquido citado previamente, pero solidificado con agar al 1,5%.

1.2.5. *Depósito de la cepa microalgal*

Una muestra de la cepa microalgal proporcionada por esta invención ha sido depositada en la Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP), Dunstaffnage Marine Laboratory, Escocia, Reino Unido, el 3 de Agosto de 1993, correspondiéndole el n° de depósito CCAP 927/15.

1.3. *Mantenimiento de la microalga*

La microalga puede mantenerse en medio líquido o en agar, utilizando el medio de cultivo antes mencionado (véase el Ejemplo 2 para una descripción detallada de la composición del medio de cultivo). Para los cultivos de reserva se pueden utilizar, por ejemplo, matraces Erlenmeyer de 100 ml, taponados con algodón graso, sin agitación y sin aireación, y mantenidos bajo iluminación continua a la intensidad de 50 W/m^2 .

1.4. *Cultivo continuo*

El cultivo continuo se puede llevar a cabo en un fermentador o fotobiorreactor provisto de los elementos de control adecuados, concretamente, elementos de control de pH, oxígeno disuelto, agitación, temperatura, aireación, iluminación, suministro de nutrientes y antiespumante, que, preferiblemente, disponga de una salida da comuni-

cación en serie que permita su supervisión, control y captura de datos mediante un ordenador.

La medida del PH se puede realizar mediante un electrodo adecuado, ejerciéndose el control del pH mediante, por ejemplo, un controlador proporcional-integral-derivada (PID) que opera sobre dos bombas conectadas a unos depósitos de ácido o base. De forma simultánea y ventajosa, el controlador puede operar sobre una electroválvula que permita la adición de CO₂ puro a la corriente de aireación, para que el control del pH se ejerza sin añadir disoluciones ácidas y cubriendo el requerimiento de CO₂ por parte de las células al objeto de que éstas mantengan su actividad fotosintética.

La medida de oxígeno disuelto puede realizarse mediante, por ejemplo, el empleo de un electrodo polarográfico, pudiéndose ejercer el control del oxígeno disuelto mediante un controlador PID que actúa variando la velocidad de agitación en función del contenido de oxígeno en el seno del cultivo.

La agitación puede producirse, por ejemplo, por un servomotor desmontable. La velocidad de agitación puede ser controlada por un sistema que suministra la potencia necesaria para mantenerla independientemente de la viscosidad del medio. Sobre el eje del agitador pueden estar fijadas unas turbinas provistas de paletas.

La temperatura puede medirse en el seno del cultivo con una sonda apropiada y puede ser controlada por un controlador PID que actúa sobre el caudal que baña la camisa de termostatación del fermentador.

El aire a introducir debe ser esterilizado, por ejemplo, por filtración a través de cartuchos Millipore de 0,22 μm . Antes del filtro de esterilización, puede introducirse el caudal de CO₂ que viene de la electroválvula (control de pH) mezclándolo así con el aire antes de introducirlo al seno del cultivo.

La intensidad de la iluminación incidente, puede ser proporcionada por lámparas apropiadas.

Para el cultivo continuo de la cepa microalgal, en primer lugar se esteriliza el fotobiorreactor en conjunto, por ejemplo, en un autoclave a 120°C y 2 atmósferas durante 60 minutos.

El medio de cultivo se puede suministrar mediante una bomba peristáltica que aspira del recipiente de reserva de medio y lo introduce en el reactor. La velocidad de flujo dependerá del diámetro del tubo de silicona utilizado y se puede regular ajustando el porcentaje de tiempo en que la bomba funciona a velocidad constante.

Para la inoculación del reactor se preparan una serie de precultivos, que consisten en unos cultivos "batch" con un caudal de aireación apropiado mantenidos en las condiciones adecuadas, en fase exponencial de crecimiento, en matraces provistos de tapón de caucho con entrada al burbujeador y salida de aire, estando ambos extremos provistos de filtros Millipore de 0,22 μm .

La toma de muestras de cultivo puede realizarse mediante un tubo en U, que en una realización particular puede estar provisto de una válvula de cierre, un alojamiento para el frasco receptor y una pera de goma para succionar.

El efluente del reactor se almacena en un recipiente de cosechado, separándose periódicamente la biomasa por centrifugación como un lodo denso que se congela y liofiliza.

Operando en las condiciones descritas previamente, se ha podido comprobar que la cepa microalgal proporcionada por esta invención tiene una velocidad específica de crecimiento máxima en cultivos continuos de 0,038 h⁻¹.

2. Empleo de la cepa microalgal en acuicultura

Debido al elevado contenido en EPA y DHA que presenta la cepa microalgal proporcionada por esta invención, se ha ensayado su empleo en la nutrición de larvas de moluscos, comprobándose que la cantidad de microalgas de esta invención que satisface el requerimiento nutricional de las larvas de *Pecten maximus* es de 10⁴ células de *Isochrysis galbana* [CCAP 927/15] por larva de *Pecten maximus* y por ml de cultivo.

3. Obtención de un aceite rico en EPA y en DHA

La invención proporciona un procedimiento para la obtención de un aceite rico en EPA y en DHA que comprende cultivar, bajo condiciones adecuadas, una cepa de la microalga marina *Isochrysis galbana* [CCAP 927/15] y aislar el aceite rico en EPA y en DHA.

Las condiciones de cultivo que permiten maximizar la productividad en PUFA incluyen las de mantener un cultivo en quimiostato a una velocidad de dilución de 0,024 h⁻¹, aumentar el aporte de nutrientes del medio de Ukeles [citado supra] de modo que el contenido de micronutrientes se multiplica por dos y el de macronutrientes por cuatro, mantener una aireación y agitación suaves, aportar dióxido de carbono mediante un pH-stato fijando como pH de control un valor de 8,00, mantener la intensidad de irradiación incidente en torno a 420 W/m² en el espectro visible y mantener la temperatura a unos 20°C aproximadamente.

Para el aislamiento del aceite rico en EPA y DHA, la biomasa microalgal liofilizada previamente separada se trata con alcohol, preferentemente etanol, en una relación de 1 g de biomasa por 75 ml de alcohol, bajo agitación a temperatura ambiente durante 1 hora, con lo que se obtiene un extracto que contiene los lípidos de la microalga. A continuación, los lípidos contenidos en la disolución alcohólica se extraen con cloroformo, en una relación de 100 ml de cloroformo por gramo de biomasa microalgal, mediante 5 extracciones parciales con 20 ml de cloroformo cada una (5x20 ml), eliminándose posteriormente el disolvente por evaporación a vacío. Todo el procedimiento se realiza en atmósfera de nitrógeno.

La cantidad típica promedio de aceite rico en EPA y DHA obtenida con la cepa microalgal proporcionada por esta invención es de 106,4 mg.l⁻¹.h⁻¹. El aceite así obtenido tiene un contenido medio de un 30% aproximadamente en EPA y de un 10% aproximadamente en DHA.

4. Extracción de EPA

Adicionalmente, la invención proporciona un procedimiento para la obtención de EPA que comprende cultivar, bajo condiciones adecuadas, una cepa de la microalga marina *Isochrysis galbana* [CCAP 927/15] y aislar el EPA formado.

Las condiciones adecuadas de cultivo de la

cepa microalgal son las mismas que las citadas en el apartado anterior ya que con ellas se obtiene una maximización en la productividad de EPA.

Para la separación del EPA de la biomasa microalgal se lleva a cabo un proceso que, básicamente, consta de las fases siguientes:

- a) extracción de los ácidos grasos contenidos en la biomasa por saponificación directa de la misma con una disolución alcalina en un alcohol, preferentemente KOH en etanol, durante 8 horas a temperatura ambiente, con una relación biomasa/sistema extractante de 1 g de biomasa por 75 ml de alcohol, más 1,6 g de KOH por cada gramo de biomasa;
- b) concentración en EPA del extracto de ácidos grasos anterior mediante la reacción con urea, utilizando metanol como disolvente, en una relación urea:ácidos grasos (p:p) de 4:1 y con una temperatura final de cristalización de los aductos de 4°C; y
- c) purificación final del EPA mediante la separación de una fracción de muy alta pureza en EPA por HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) utilizando el concentrado anteriormente descrito, una columna de fase reversa C18, una fase móvil constituida por metanol-agua (1% ácido acético [AcH])(80:20) o etanol-agua (1% AcH)(70:30) y con una velocidad de flujo de 3,5 cm/min para el sistema metanol-agua, y de 1,75 cm/min para el sistema etanol-agua.

La caracterización del EPA obtenido se puede realizar por cromatografía de gases de la fracción obtenida y por espectroscopía de absorción en el ultravioleta de la misma fracción.

La cantidad típica promedio de EPA obtenida con la cepa microalgal proporcionada por esta invención es de, aproximadamente, 23,2 mg.l⁻¹.h⁻¹, mientras que la cantidad típica promedio de DHA obtenida con dicha cepa microalgal es de 6,3 mg.l⁻¹.h⁻¹ aproximadamente.

El empleo de la cepa microalgal proporcionada por esta invención presenta las siguientes ventajas:

- a) biomasa con un olor marino agradable;
- b) biomasa libre de metales pesados, pesticidas o cualquier otro contaminante ya que se cultivan en condiciones controladas;
- c) producción estable a lo largo de todo el año debido al cultivo en condiciones controladas;
- d) composición química fiable y estable;
- e) aceptación óptima por todas las personas ya que son una fuente vegetal;
- f) ausencia prácticamente total de colesterol;
- g) materia prima adecuada para procesos de extracción debido a la fiabilidad y estabilidad de su composición; y

- h) etiqueta de “producto de microalgas” que es óptima para el mercado.

La expresión “cepa microalgal proporcionada por esta invención” pretende incluir no sólo la cepa de la microalga marina *Isochrysis galbana* [CCAP 927/15] sino cualquier mutante o variante de la misma capaz de producir niveles similares de EPA y DHA.

Los siguientes Ejemplos sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención y no deben ser considerados en sentido limitativo de su alcance sino como ilustrativos de la misma.

Ejemplo 1

Aislamiento de la cepa microalgal

Se cultivaron diferentes cepas o clones de distintos microorganismos bajo condiciones adecuadas, en cada caso, de nutrientes, luz, temperatura, pH y aireación.

A continuación, se extrajeron los lípidos producidos por cada cepa, mediante el método propuesto por Richardson y col., que básicamente coincide con el descrito por Kochert [*citado supra*]. Para ello, a 100 mg de biomasa, colocada en el poter manual, se adicionan 6 ml de cloroformo:metanol en una proporción 2:1 y se procede a su homogenización. Posteriormente se vierte el contenido en un tubo de rosca y se agregan 3 ml de HCl 0,1N y 0,15 ml de MgCl₂ al 0,5%, para precipitar las proteínas. Después de centrifugar a 3500 r.p.m. durante 15 minutos se separa el extracto lipídico y sobre el residuo se hace una segunda extracción, reuniendo la fase orgánica con la anterior en un tubo previamente tarado. Todo el extracto lipídico se lleva a sequedad bajo corriente de nitrógeno y se mantiene en estufa a 45°C durante 15 minutos. Pasado ese tiempo se pesa y se repite la operación hasta pesada constante, obteniendo así los lípidos totales contenidos en la biomasa seca.

A continuación, se analizaron los lípidos extraídos al objeto de determinar su composición en ácidos grasos, mediante el método de transesterificación directa descrito por Lepage y Roy [*citado supra*]. Para ello, en un tubo de rosca se colocan 10 mg de biomasa seca a la que se adiciona 1 ml de cloruro de acetilo-metanol en una proporción 1:500 (v/v) y un pequeño agitador magnético. Se somete a metanolisis a 100°C durante una hora. Una vez enfriado el contenido a temperatura ambiente se añaden 1 ml de hexano y 1 ml de agua destilada, se agita y se centrifuga para ser almacenado a 4°C. Antes de la inyección en el cromatógrafo, se lleva a sequedad bajo corriente de nitrógeno y se resuspende en 100 µl de hexano.

Para la cuantificación de los ácidos grasos, se agregan, antes de la metanolisis de Lepage y Roy, 5 µl de disolución de ácido nonadecanoico preparada pesando 31,25 mg del patrón puro de SIGMA que se llevan a 1 ml usando como disolvente una mezcla de metanol-benceno 3:2. La utilización de un método basado en el empleo de un patrón interno requiere además la evaluación de los distintos coeficientes de respuesta del detector de ionización de llama (FID, Flame-Ionization-Detector) ante cada especie a detectar, pues difieren en insaturación y número de carbonos en la cadena. Para ello se llevó a cabo una calibración

en la cual se determinó la respuesta del detector ante cantidades iguales de ácidos de 14, 16, 18, 20 y 22 carbonos provenientes de patrones de SIGMA.

La determinación de la naturaleza y contenido de cada uno de los ésteres metílicos se efectúa en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5930A provisto de detector de ionización de llama, conectado a un integrador HP 3394, con el siguiente programa de temperaturas: temperatura inicial del horno 150°C durante 8 minutos y a continuación 3°C/min hasta conseguir 190°C, permaneciendo en esta temperatura durante 25 minutos.

Se ha utilizado una columna capilar (SUPELCO) de sílice fundida de alta polaridad SP2330 de 30 m de longitud y 0,25 mm de diámetro interno y 0,2 μ m de espesor de película. El flujo de gas portador (N₂) es de 0,8 ml/min equivalente a una velocidad lineal de 0,268 m/s, y la relación de venteo es de 100:1. Tanto la temperatura del inyector como la del detector es de 220°C.

En todas las determinaciones se inyectan 2 μ l de disolución de ésteres metílicos. Los patrones utilizados son "PUFAs-1" y "PUFAs-2", n° de catálogo 4-7017 y 4-7033 de SUPELCO y "Lipid Standard", n° de catálogo 189-15 de SIGMA.

Finalmente, se seleccionaron las cepas o clones que produjeron mayor cantidad de EPA y de DHA, determinados estudiados para establecer su clasificación taxonómica, encontrándose que la cepa que produjo mayor cantidad de EPA (aproximadamente un 4,65% sobre peso seco de biomasa) y de DHA (aproximadamente un 1,42% sobre peso seco de biomasa) resultó ser una cepa de un alga microscópica marina, de la especie *Isochrysis galbana* Parke, depositada en la CCAP con el n° de accesión CCAP 927/15, cuyas características se mencionan en el apartado 2 anterior.

Ejemplo 2

Mantenimiento de la cepa microalgal

La cepa microalgal proporcionada por esta invención puede mantenerse en un medio de cultivo líquido, tal como el constituido por el medio de Ukeles modificado [Ukeles, R., *citado supra*], al que se le agrega agua de mar filtrada a través de un filtro Millipore de 0,22 μ m, o en un medio de cultivo sólido que contiene el mismo medio de cultivo líquido citado previamente, pero solidificado con agar al 1,5%. Para los cultivos de reserva se pueden utilizar matraces Erlenmeyer de 100 ml, taponados con un algodón graso, sin agitación y sin aireación, y mantenidos bajo iluminación continua a una intensidad de 50 W/m².

Composición del medio de cultivo líquido

El medio de cultivo es una modificación del propuesto por Ukeles, [Ukeles, R., *citado supra*] con una relación N/P de 20. Se prepara añadiendo 10 ml de una disolución de reserva, cuya composición se muestra en la Tabla 1, por cada litro de agua de mar filtrada mediante un filtro Millipore de 0,22 μ m de tamaño de poro. El medio así preparado se esteriliza en autoclave a 120°C y 2 atm durante 60 minutos. Finalmente, justo antes de la inoculación, se añade 1 ml de la disolución de vitaminas que se indica en la Tabla 2.

TABLA 1

Composición de la disolución de reserva

Componente	Concentración (g/l)
NaNO ₃	17,0
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	1,56
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,0198
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,0242
ZnCl ₂	0,0136
CoCl ₃	0,0015
CuSO ₄	0,00159
Citrato férrico	0,49
EDTA	0,968

TABLA 2

Composición de la disolución reserva de vitaminas

Vitamina	Concentración (mg/l)
Tiamina	35
Biotina	5
Cobalamina	3

Ejemplo 3

Cultivo continuo de la cepa microalgal

3.1 Instrumentación

Se realizó el cultivo continuo de la cepa microalgal proporcionada por esta invención en un fermentador de 5 litros de capacidad (New Brunswick Scientific Bioflo III), provisto de los elementos de control de pH, oxígeno disuelto, agitación, temperatura, suministro de nutrientes y antiespumante que dispone a su vez de salida de comunicación en serie que permite su supervisión, control y captura de datos mediante ordenador. Dicho fermentador consiste en un cuerpo cilíndrico de vidrio (diámetro interno 17 cm y 31 cm de profundidad), encamisado en su parte inferior con acero inoxidable, donde se aloja el circuito de termostatación por el que circula agua de temperatura controlada. La pared de vidrio dispone en su parte superior de cuatro conexiones esterilizables de polipropileno, para permitir la adición de antiespumante, nutrientes, salida de cultivo como rebosadero, etc.

El cuerpo cilíndrico está cerrado superiormente por un disco de acero inoxidable en el que se encuentran los orificios necesarios para la inoculación, suministro de medio, adición de ácido o base para control de pH, vaina metálica para colocar la sonda de temperatura, distribuidor de gas, cosechado, tubo de toma de muestra, condensador del aire efluente, electrodos de oxígeno disuelto y de pH. Asimismo, se encuentran incorporados el eje del agitador y su engranaje montados sobre una junta estanca que garantiza el aislamiento del exterior.

La agitación es producida por un servomotor desmontable, colocado sobre el engranaje del eje del agitador en el disco de cubierta del reactor. Puede retirarse fácilmente para el lavado y esterilizado del recipiente, y colocarse de nuevo para su reutilización. La velocidad de agitación puede variarse de 25 a 1000 r.p.m. y se encuen-

tra controlada por el sistema que suministra automáticamente la potencia necesaria para mantenerla independientemente de la viscosidad del medio. Sobre el eje están fijadas dos turbinas de 6 paletas, colocadas la inferior a un diámetro de turbina desde el fondo del recipiente, y la superior a un diámetro y medio sobre la turbina inferior. El reactor está provisto de cuatro tabiques deflectores de 20,3 x 1,6 cm separados 0,3 cm de la superficie interna.

La medida del pH se realiza mediante un electrodo combinado Ingold esterilizable. El control, en el intervalo de 2,00 a 12,00, se ejerce mediante un controlador PID que opera sobre dos bombas peristálticas conectadas a los orificios de adición de ácido o base. Simultáneamente, el controlador opera sobre una electroválvula que permite la adición de CO₂ puro a la corriente de aireación para el control del pH sin adición de disoluciones ácidas, cubriendo el requerimiento de CO₂ por parte de las células para mantener su actividad fotosintética.

Para la medida del oxígeno disuelto se utiliza un electrodo polarográfico Ingold. La medida del oxígeno disuelto se facilita en forma de porcentajes de saturación. El control [5-95%] se puede realizar con un controlador PID que actúa variando la velocidad de agitación en función del contenido de oxígeno en el seno del cultivo.

La temperatura puede seleccionarse en el intervalo de 4 a 80°C, medida en el seno del cultivo con una sonda de resistencia (Pt-100), y es controlada por un controlador PID que actúa sobre el caudal que baña la camisa de termostatación del fermentador.

El aire (1,5 l/min), esterilizado por filtración a través de cartuchos Millipore de 0,22 μm, es introducido en el reactor a través de un distribuidor toroidal (diámetro 6 cm) en el fondo del recipiente, concéntrico al eje del agitador, en el que se han practicado cuatro orificios de salida de aire (diámetro interior [Di] 0,75 mm) equidistantes entre sí. Antes del filtro de esterilización, se introduce el caudal de CO₂ que viene de la electroválvula (control de pH) mezclándolo así con el aire antes de introducirlo al seno del cultivo.

La intensidad de iluminación incidente es de, aproximadamente, $5,842 \times 10^{16}$ quanta.cm⁻².S⁻¹ (208 W/m²) proporcionada por lámparas fluorescentes Osram Dulux EL (20W) de luz de día, con un reflector de aluminio que proyecta todo el haz luminoso hacia el cultivo desde una disposición circular simétrica en torno al fotobiorreactor y lo más próximas posible a su superficie.

3.2 Procedimiento

En primer lugar, el fotobiorreactor, en conjunto, se esteriliza en un autoclave a 120°C y 2 atm durante 60 minutos, incluidas las sondas de pH y oxígeno disuelto. También se esterilizan las gomas de silicona, los tubos de adición, goteros y filtros. En condiciones idénticas se esterilizan los botellones de 5 litros destinados a reservorio de medio y cosechado, los tapones de goma y las conducciones. Todas las manipulaciones se llevan a cabo bajo campana de flujo laminar.

A continuación, se suministra el medio de cultivo (Ejemplo 2), mediante una bomba pe-

ristáltica que aspira del recipiente de reserva del medio y lo introduce en el reactor por uno de los orificios de la cubierta superior dispuesto para ello.

5 El recipiente de reserva consiste en un botellón de 5 litros de capacidad, de cuello estrecho, cerrado mediante un tapón de caucho doblemente perforado. Una de las perforaciones se corresponde con la salida del medio hacia la bomba peristáltica, y la otra con la apertura, para mantener la presión atmosférica dentro del recipiente, estando provista de un filtro de un cartucho Millipore de 0,22 μm para mantener la esterilidad.

10 Simultánea o posteriormente, se inocula el reactor con un precultivo de la cepa microalgal proporcionada por esta invención que consiste en un cultivo "batch" con un caudal de aireación de $1 \text{ v.v}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, mantenido bajo iluminación continua con una intensidad de 50 W/m², en fase exponencial de crecimiento, en matraces de un litro de capacidad, provistos de tapón de caucho con entrada al burbujeador y salida de aire, ambas provistas de filtros Millipore de 0,22 μm.

15 La toma de muestras del cultivo se realiza mediante un tubo en U, provisto de válvula de cierre, alojamiento para el frasco receptor y pera de goma para succionar. Para mantener la esterilidad del cultivo, con la válvula cerrada se presiona la pera, se encaja herméticamente el frasco receptor y se abre la válvula. Una vez succionada la cantidad de muestra requerida, se cierra la válvula y se retira el frasco con la muestra.

20 El efluente del reactor se almacena en un recipiente de cosechado. Periódicamente, por centrifugación, se separa la biomasa como un lodo denso que es congelado y liofilizado.

Operando en las condiciones antes descritas, es decir, en particular, cultivando la cepa microalgal a 20°C en un fermentador de 5 litros agitado por paletas y con una iluminación continua en torno a 420 W/m², se produce una biomasa microalgal en una cantidad de 0,5 g/l.d.

Ejemplo 4

Empleo de la cepa microalgal en acuicultura

45 Se realizó este ejemplo para evaluar la utilidad de la cepa microalgal proporcionada por esta invención en acuicultura, en concreto, como componente de la nutrición de larvas de moluscos. Para ello, se añadieron distintas cantidades de células de la cepa microalgal de esta invención a recipientes que contenían distinto número de larvas de *Pecten maximus* en distintos volúmenes, observándose que la cantidad de microalgas que satisface el requerimiento nutricional de las larvas de *Pecten maximus* es de 10⁴ células de *Isochrysis galbana* por larva de *Pecten maximus* y por ml de cultivo.

Ejemplo 5

Obtención de un aceite rico en EPA y en DHA

60 Al objeto de maximizar la productividad en ácidos poliinsaturados, la cepa microalgal proporcionada por esta invención se cultivó bajo unas condiciones que incluyen mantener un cultivo de la cepa microalgal en quimiostato a una velocidad de dilución de 0,024 h⁻¹, aumentar el aporte de nutrientes del medio de Ukeles (Ejemplo 2) de modo que el contenido de micronutrientes se

multiplique por dos y el de macronutrientes por cuatro, mantener una aireación y agitación suaves, aportar dióxido de carbono mediante un pH-stato fijando como pH de control un valor de 8,00, mantener la intensidad de irradiación incidente en torno a 420 W/m² en el espectro visible y mantener la temperatura a unos 20°C aproximadamente.

La biomasa microalgal se trata con etanol de 96°, en una relación de 1 g de biomasa por 75 ml de alcohol, bajo agitación a temperatura ambiente durante 1 hora, con lo que se obtuvo un extracto con los lípidos de la biomasa microalgal. A continuación, los lípidos contenidos en la disolución alcohólica se extraen con cloroformo, en una relación de 100 ml de cloroformo por cada gramo de biomasa microalgal, efectuándose dicha extracción mediante 5 extracciones parciales con 20 ml de cloroformo cada una de ellas (5 x 20 ml), eliminándose posteriormente el disolvente por evaporación a vacío. Todo el procedimiento se realiza en atmósfera de nitrógeno.

La caracterización de los lípidos en ácidos grasos se realiza por transesterificación directa según el método de Lepage y Roy [*citado supra*] analizándose y cuantificándose los ésteres metílicos obtenidos por cromatografía de gases.

Un perfil característico de los ácidos grasos presentes en la cepa microalgal proporcionada por esta invención, sobre peso seco de biomasa, es el siguiente:

Acido graso	Porcentaje sobre peso seco de biomasa
14:0	1,79
16:0	2,35
16:1	2,71
16:2n4	0,04
16:3n4	0,05
16:4n21	0,04
18:0	0,07
18:1n9	0,15
18:2n6	0,34
18:2n4	0,03
18:3n6	0,06
18:3n3	0,12
20:1n9	0,02
18:4n3	1,60
20:2n6	0,03
20:4n6	0,06
20:5n3 (EPA)	4,65
22:6n3 (DHA)	1,42

La cantidad típica promedio de aceite rico en EPA y DHA obtenida con la cepa microalgal proporcionada por esta invención es de, aproximadamente, 106,4 mg.l⁻¹.h⁻¹.

Ejemplo 6

Extracción de EPA a partir de la cepa microalgal

Manteniendo las mismas condiciones de cultivo citadas en el Ejemplo 5, se obtiene una maximización en la productividad en EPA. Para la separación del EPA se lleva a cabo un proceso que, básicamente, consta de:

- aponificar directamente los ácidos grasos contenidos en la biomasa microalgal mediante la adición de una disolución de KOH en etanol de 96° durante 8 horas a temperatura ambiente, en una relación de 1 g de biomasa por 75 ml de alcohol, más 1, 6 g de KOH por gramo de biomasa, con lo que se obtiene un extracto de ácidos grasos;
- tratar el extracto de ácidos grasos previamente obtenido con urea, en metanol, en una relación urea:ácidos grasos (p:p) de 4:1 y con una temperatura final de cristalización de los aductos de 4°C, al objeto de concentrar el EPA formado; y
- purificar el EPA mediante HPLC, utilizando el concentrado anteriormente descrito y en las siguientes condiciones cromatográficas:

- Columna de fase reversa C18

- Fase móvil: metanol-agua (1% ácido acético [AcH])(80:20), o etanol-agua (1% AcH)(70:30)

- Velocidad de flujo:

3,5 cm/min para el sistema metanol-agua, y

1,75 cm/min para el sistema etanol-agua.

La caracterización del EPA obtenido se puede realizar por cromatografía de gases de la fracción obtenida y por espectroscopía de absorción en el ultravioleta de la misma fracción.

La cantidad típica promedio de EPA obtenida con la cepa microalgal proporcionada por esta invención es de, aproximadamente, 23,2 mg.l⁻¹.h⁻¹, mientras que la cantidad típica promedio de DHA obtenida con dicha cepa microalgal es de 6,3 mg.l⁻¹.h⁻¹ aproximadamente.

REIVINDICACIONES

1. Una cepa de la microalga marina *IsochrYSIS galbana*, productora de ácido eicosapentaenoico (EPA) y de ácido docosahexaenoico (DHA), depositada en la Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP) con el n° de depósito CCAP 927/15 o un mutante o variante de la misma.

2. Una cepa de *IsochrYSIS galbana*, según la reivindicación 1, **caracterizada** porque crece adecuadamente en un intervalo de temperatura comprendido entre 18°C y 25°C, preferentemente a 20°C.

3. Una cepa de *IsochrYSIS galbana*, según la reivindicación 1, **caracterizada** porque crece en un intervalo de pH comprendido entre 7 y 9,5, preferentemente a un pH de 7,65 a 8,00.

4. Una cepa de *IsochrYSIS galbana*, según la reivindicación 1, **caracterizada** porque requiere la adición de vitaminas, tales como biotina, tiamina y cianocobalamina, para un desarrollo adecuado de los cultivos.

5. Una cepa de *IsochrYSIS galbana*, según la reivindicación 1, **caracterizada** porque cultivada a 20°C en un fermentador agitado por paletas y con iluminación continua, produce biomasa microalgal en una cantidad de 0,5 g/l-d.

6. Una cepa de *IsochrYSIS galbana*, según la reivindicación 5, **caracterizada** porque cultivada a iluminación continua, produce biomasa microalgal susceptible de ser utilizada para la extracción de un aceite con un contenido de aproximadamente un 30% en peso en EPA y de aproximadamente un 10%, en peso, en DHA.

7. Una cepa de *IsochrYSIS galbana*, según las reivindicaciones anteriores, **caracterizada** porque cultivada a 20°C en un fermentador agitado por paletas y con iluminación continua, produce EPA en una cantidad de, al menos, 39,5 mg por gramo de materia seca.

8. Uso de una cepa de la microalga marina *IsochrYSIS galbana*, según las reivindicaciones 1 a 7, en la nutrición de larvas de peces y moluscos.

9. Uso de una cepa de la microalga marina *IsochrYSIS galbana*, según las reivindicaciones 1 a 7, para la obtención de ácido eicosapentaenoico (EPA).

10. Uso de una cepa de la microalga marina *IsochrYSIS galbana*, según las reivindicaciones 1 a 7, para la obtención de un aceite rico en ácido eicosapentaenoico (EPA) y en ácido docosahexaenoico (DHA).

11. Un procedimiento para la obtención de un aceite rico en ácido eicosapentaenoico (EPA) y en

ácido docosahexaenoico (DHA), que comprende cultivar, bajo condiciones adecuadas, una cepa de la microalga marina *IsochrYSIS galbana*, según las reivindicaciones 1 a 7 y aislar el aceite rico en EPA y en DHA.

12. Un procedimiento según la reivindicación 11, **caracterizado** porque el cultivo de dicha cepa de *IsochrYSIS galbana* se efectúa a un pH de 8, con una intensidad de irradiación incidente en torno a 420 W/m² y a una temperatura de 20°C aproximadamente.

13. Un procedimiento según la reivindicación 11, **caracterizado** porque para el aislamiento del aceite rico en EPA y DHA, se trata la biomasa microalgal con etanol, en una relación de 1 g de biomasa por 75 ml de alcohol, bajo agitación a temperatura ambiente durante 1 hora, y posterior extracción de los lípidos contenidos en la disolución alcohólica con cloroformo, en una relación de 100 ml de cloroformo por gramo de biomasa microalgal, en atmósfera de nitrógeno.

14. Un procedimiento para la obtención de ácido eicosapentaenoico (EPA), que comprende cultivar, bajo condiciones adecuadas, una cepa de la microalga marina *IsochrYSIS galbana*, según las reivindicaciones 1 a 7 y aislar el EPA formado.

15. Un procedimiento según la reivindicación 14, **caracterizado** porque el cultivo de dicha cepa de *IsochrYSIS galbana* se efectúa a un pH de 8, con una intensidad de irradiación incidente en torno a 420 W/m² y a una temperatura de 20°C aproximadamente.

16. Un procedimiento según la reivindicación 14, **caracterizado** porque la extracción del EPA de la biomasa microalgal comprende las etapas siguientes:

- a) extracción de los ácidos grasos contenidos en la biomasa por saponificación directa de la misma con una disolución alcalina en etanol, durante 8 horas a temperatura ambiente, con una relación biomasa microalgal:sistema extractante de 1 g de biomasa por 75 ml de alcohol, más 1,6 g de álcali por gramo de biomasa;
- b) concentración en EPA del extracto de ácidos grasos obtenido en la etapa a) mediante la reacción con urea, utilizando metanol como disolvente, en una relación urea:ácidos grasos (p:p) de 4:1 y con una temperatura final de cristalización de los aductos de 4°C; y
- c) purificación final del EPA mediante HPLC.



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁶: C12N 1/12, C12P 7/64, A23K 1/18 // (C12P 7/64, C12R 1:89)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	LOPEZ ALONSO, et al. Isolation of clones of <i>Isochrysis galbana</i> rich in eicosapentaenoic acid. 1992. <i>Aquaculture</i> 102, páginas 363-371	1-11,14
Y		12,13,15,16
Y	SANCHEZ PEREZ. n-3 polyunsaturated fatty acid productivity of the marine microalga <i>Isochrysis galbana</i> . Growth conditions and phenotypic selection. 1994. <i>Journal of Applied Phycology</i> 6, páginas 475-478	12,15
Y	MOLINA GRIMA et al. Comparison between extraction of lipids and fatty acids from microalgal biomass. 1994. <i>J. Am. Oil Chem. Soc.</i> 71 (9), páginas 955-959	13,16
Y	HAAGSMA et al. Preparation of an omega-3 fatty acid concentrate from cod liver oil. 1982. <i>J. Am. Oil. Chem. Soc.</i> 59 (3), páginas 117-118	16
A	MOLINA GRIMA et al. Biochemical productivity and fatty acid profiles of <i>Isochrysis galbana</i> Parke and <i>Tetraselmis</i> sp: as a function of incident light intensity. 1994. <i>Process Biochemistry</i> 29, páginas 119-126	
A	MOLINA GRIMA et al. Effect of growth rate on the eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid content of <i>Isochrysis galbana</i> in chemostat culture. 1994. <i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> , 41 páginas 23-27	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
01.07.96

Examinador
A. Polo Díez

Página
1/2



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁶: C12N 1/12, C12P 7/64, A23K 1/18 // (C12P 7/64, C12R 1:89)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	EP-459744-A (THE SCOTTISH AGRICULTURE COLLEGE) 04.12.91	
A	US-4615839-A (SETO et al.) 07.10.86	
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN, Vol. 18, n° 597 (C-1273). 1994 JP-6225778-A (SEISHI NOKIHARA)	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n°:

Fecha de realización del informe

01.07.96

Examinador

A. Polo Díez

Página

2/2