

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 712 298**

51 Int. Cl.:

C12N 1/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.10.2014 PCT/ES2014/070780**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.04.2016 WO16059262**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.10.2014 E 14903872 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2018 EP 3109315**

54 Título: **Procedimiento de enriquecimiento de biomasa de microalgas en ácidos grasos poliinsaturados**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.05.2019

73 Titular/es:
**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (50.0%)
Edificio Emprendia, Campus Vida
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES y
ALGAENERGY S. A. (50.0%)**

72 Inventor/es:
**OTERO CASAL, ANA MARÍA;
FREIRE FONTÁNS, ISABEL;
MILHAZES DA CUNHA, HUGO ALEXANDRE;
SEGURA FORNIELES, MARÍA y
JIMÉNEZ MARTÍN, JUAN PABLO**

74 Agente/Representante:
LÓPEZ CAMBA, María Emilia

ES 2 712 298 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de enriquecimiento de biomasa de microalgas en ácidos grasos poliinsaturados

5 **SECTOR DE LA TÉCNICA**

La presente invención se refiere a un procedimiento para el enriquecimiento de biomasa de microalgas en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. Más concretamente, se refiere a microalgas del género *Nannochloropsis*. También se refiere a los productos obtenidos mediante ese procedimiento y sus usos.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Las especies del género *Nannochloropsis* pertenecen a la División Eustigmatophyta, Clase Eustigmatophyceae, Orden Eustigmatales, Familia Monodopsiadaceae (Hibberd, 1981, Bot J Linnean Society 82:93-119). La clase se separó de las Xantophyceae en base a su estructura, citología y posteriormente por su composición de pigmentos, al carecer de clorofila b (Hibberd & Leedale, 1972, Annals of Botany 36:49-71; Whittle & Casselton, 1975, British Phycological Journal 10:179-191).

15

20

25

30

35

40

Las células de *Nannochloropsis* son cocoides, con un diámetro aproximado de 2-4 μm , carecen de flagelos y no presentan estados móviles. Presentan color verde-amarillo, por lo que pueden ser confundidas con las *Chlorophyta* (Santos, 1996, Beiheft Nova Hedwigia 112:391-405) lo que ha llevado a que existan diversas publicaciones en las que se denomina *Chlorella* marina a las especies de *Nannochloropsis* (Maruyama et al., 1986, Jap. J. Phycol. 34:319-325; Watanabe et al. 1983, Aquaculture 34:115-143). Además de las diferencias morfológicas y en la composición de pigmentos, ya que las *Chlorophyta* presentan clorofilas a y b, mientras que las *Eustigmatophyceae* presentan solamente clorofila a, además de diversos carotenoides, que pueden ser utilizados como carácter taxonómico (Jeffrey & Vesk, 1997, Phytoplankton pigments in oceanography. S.W. Jeffrey, R.F.C. Mantoura, S.W. Wright (eds). UNESCO Publishing Paris, pp 37-84; Lubian & Establier, 1982, Investigación Pesquera 46:379-389), ambos grupos presentan importantes diferencias en el perfil de ácidos grasos, ya que mientras que las clorófitas no contienen ácidos grasos de más de 18 átomos de carbono, las especies del género *Nannochloropsis* presentan un elevado porcentaje del ácido graso poliinsaturado de la serie omega-3 eicosapentaenoico (20:5 n-3, EPA) (Ferreira et al. 2009, Mar Biotechnol 11:585-595; Sukenik et al. 1993, Cohen, Z. (Ed.), Chemicals from Microalgae. Taylor and Francis, London, p 41-56) que puede llegar a representar el 25 % de los ácidos grasos de este grupo y que además de ser esencial para su aplicación en acuicultura, posee diversas propiedades funcionales en animales y humanos (Siriwardhana et al. 2012, Se-Kwon Kim, Editor(s), Advances in Food and Nutrition Research, Academic Press, 2012, Volume 65, Pages 211-222), lo que hace importante este género desde el punto de vista biotecnológico y farmacológico. La mayor parte de las especies descritas pertenecen a hábitats marinos o salobres, describiéndose la primera especie de agua dulce, *Nannochloropsis limnetica* en el año 2000 (Krienitz et al., 2000, Phycologia 39:219-227). La composición de ácidos grasos de *N. limnetica* es similar a las de las especies marinas, con un contenido de EPA que pueda alcanzar el 24 % del total de ácidos grasos (Freire et al. 2013, Aquaculture Conference 2013: Celebrating 40 Years of Aquaculture – Noviembre, 2013, Gran Canaria (España); Krienitz et al. 2006; Phycologia 39:219-227).

45

50

55

60

Diversas especies marinas del género *Nannochloropsis* son cultivadas en todo el mundo para ser utilizadas en la cadena de alimento vivo para el cultivo larvario de peces marinos, siendo de las especies más comúnmente utilizadas en maricultura. La principal aplicación de las especies marinas del género *Nannochloropsis* es el cultivo de rotíferos del género *Brachionus* que son utilizados como alimento vivo para las larvas de peces marinos. El cultivo de rotíferos es un proceso que requiere elevadas cantidades de microalgas, ya que éstas constituyen la única dieta que permite producciones sostenidas y estables en cultivo continuo, con densidades elevadas (Yoshimura et al. 2003, Aquaculture 227:165-172; Bentley et al. 2008, J World Aquac Soc 39:625-635). Además, las microalgas del género *Nannochloropsis* producen un mejor crecimiento y composición bioquímica del rotífero que la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que puede también utilizarse como alimento para el rotífero (Luzbens et al., 1995, Aquaculture 133:295-309) o que otras dietas artificiales (Aragão et al., 2004, Aquaculture 234: 429-445; Srivastava et al. 2006, Aquaculture 254:534-543; Koiso et al. 2009, Nippon Suisan Gakk 75:828-833). El elevado contenido en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (PUFAs), especialmente en EPA, de las especies del género *Nannochloropsis* ha sido identificado como la causa de su elevado valor nutritivo para acuicultura, tanto en el caso del rotífero *Brachionus plicatilis* alimentado con especies marinas de este género (Watanabe et al. 1983, Aquaculture 34:115-143), como en el caso del mejillón cebra (*Dreissena polymorpha*), la pulga de agua *Daphnia magna* o la almeja de agua dulce *Corbicula fluminea* alimentados con al especie de agua dulce *Nannochloropsis limnetica* (Wacker & von Elert 2003, Oecologia 135:332-338; Wacker et al., 2002, Limnol. Oceanogr. 47:1242-1248; Basen et al., 2012, Oecologia 170:57-64; Wacker & Martin-Creuzburg, 2007, Functional ecology 21:738-747). Recientemente se ha descrito que la especie de agua dulce *Nannochloropsis limnetica* puede ser utilizada con excelentes resultados para el cultivo de *Brachionus plicatilis* en agua de mar (Freire et al., 2013, Aquaculture Conference 2013: Celebrating 40 Years of Aquaculture – Noviembre, 2013, Gran Canaria (España)).

65

Concentrados de la microalga de agua dulce *Chlorella* también se están utilizando con éxito para el mantenimiento de cultivos densos del rotífero *Brachionus sp.*, aunque las especies marinas del género *Nannochloropsis* producen

tasas de crecimiento iguales o mayores (Hirayama & Nakamura, 1976, *Aquaculture* 8:301-307; Maruyama et al., 1997; Kobayashi et al., 2008). Debido a que la biomasa de *Chlorella* producida industrialmente en condiciones mixotróficas o heterotróficas es deficiente en vitamina B12, indispensable para el crecimiento del rotífero, los productos comerciales de esta microalga de agua dulce para su uso en acuicultura están enriquecidos en esta vitamina, que generalmente es añadida directamente en el medio de cultivo (Maruyama et al., 1989, *Nippon Suisan Gakkaishi* 55:1785-1790; Maruyama & Hirayama, 1993, *Journal of the World Aquaculture Society* 24:194-198). En el caso de las especies marinas de *Nannochloropsis*, que son cultivadas autotróficamente, no es necesaria la adición de esta vitamina en el medio de cultivo ni su enriquecimiento posterior para la obtención de tasas máximas de crecimiento en el rotífero. Además, la principal ventaja de *Nannochloropsis* sobre otras especies de algas unicelulares, y más específicamente sobre las especies de *Chlorella*, es su elevado contenido en ácido Eicosapentaenoico (EPA, 20:5(n-3)), que es transferido a través de los rotíferos a las larvas de peces, para cuyo desarrollo es esencial, estando ausente en las especies del género *Chlorella*. Actualmente, existen distintos productos comerciales refrigerados, congelados, condensados o liofilizados basados en especies marinas de *Nannochloropsis* que producen buenos resultados para el crecimiento del rotífero (Luzbens et al., 1995, *Aquaculture* 133:295-309; Navarro et al., 2001, *Hydrobiologia* 452: 69–77). Estos productos compiten con un producto comercial denominado *Chlorella* SV-12 (Pacific Tading Co., Ltd, *Chlorella* Industry Co., Ltd. <http://www.pacific-trading.co.jp/en/product/01-2.html>) que consiste en un concentrado de *Chlorella* (aprox 13,5 % de peso seco) que ha sido enriquecido artificialmente para contener un 17 % del ácido graso de cadena larga docosahexaenoico (22:6(n-3), DHA). Según reporta el prospecto técnico de este producto que se adjunta, esta biomasa contiene solamente un 2 % de EPA (relación EPA:DHA 1:8,5).

El procedimiento de enriquecimiento de *Chlorella* en DHA ha sido descrito con anterioridad para su utilización en el cultivo de rotíferos (Hayashi et al., 2001, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65:202-204). Las células de *Chlorella* fueron cultivadas heterotróficamente con glucosa añadiéndose aceite de atún (0,5 %) con un contenido del 26,8 % de DHA o ácidos grasos libres obtenidos del hidrolizado del mismo aceite durante 24 horas. Estos autores no pudieron conseguir enriquecimiento utilizando aceites y solo mediante la utilización de ácidos grasos libres pudieron conseguir el enriquecimiento de distintas especies de *Chlorella*, alcanzando un 16,9 % del total de ácidos grasos (Hayashi et al. 2001, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65:202-204), no siendo efectiva la utilización de aceites no hidrolizados. Un procedimiento similar fue aplicado para la producción de un extracto lipídico de *Chlorella* enriquecido en DHA que contuvo un 20 % de DHA (Sugimoto et al 2002. *Biol. Pharm. Bull* 25:1090-1092). En este caso el porcentaje de EPA fue ligeramente superior al 3 %. Este procedimiento, asociado al ya descrito para el enriquecimiento en vitamina B12 es la base utilizada para el producto comercial SUPER FRESH CHLORELLA SV-12 de Pacific Trading Co. Ltd.,

Las familias de patentes que describen el enriquecimiento de *Chlorella* en ácidos grasos poliinsaturados, que utilizan en todos los casos ácidos grasos libres o sus sales correspondientes, son:

- KR2005015233-A; KR768757-B1: Proceso para la producción de *Chlorella* que contiene ácidos grasos omega-3, incluidos los ácidos eicosapentaenoico (EPA) y Docosahexaenoico (DHA), que comprende la adición de monoglicéridos de EPA y DHA al medio de cultivo al final de la fermentación.
- JP10276684-A; KR98080312-A; JP3096654-B2; KR428732-B; KR423876-B. Producción de *Chlorella* que contiene ácidos grasos altamente insaturados- comprende el cultivo de *Chlorella* en medio con DHA y otros ácidos grasos altamente insaturados en forma de ácido libre o su correspondiente sal.

Por otra parte, existe una única referencia, hasta donde el solicitante tiene conocimiento, en la que se describe el enriquecimiento de una especie de *Nannochloropsis* en DHA (Wacker et al., 2002, *Limnol. Oceanogr.* 47:1242-1248). En esta referencia la especie de agua dulce *N. limnetica* fue enriquecida con EPA o DHA puros por separado o con un extracto de la microalga *Isocrysis* aff. *galbana* (Clon T-ISO) rico en DHA. Esta última especie contiene valores elevados de DHA, que sin embargo fueron transferidos con poca eficiencia a *N. limnetica*, con una relación final de 1 parte de DHA por cada 40 partes de EPA (relación peso:peso) en la biomasa enriquecida. Estos autores demuestran además claramente los beneficios del enriquecimiento de DHA para la dieta del mejillón *D. polymorpha*, a pesar de los bajos niveles de enriquecimiento logrados con su metodología (Wacker et al., 2002, *Limnol. Oceanogr.* 47:1242-1248).

El papel crucial de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga para el cultivo de diversas especies marinas ha sido documentado de forma extensiva (Watanabe et al. 1983, *Aquaculture* 34:115-143, Izquierdo, 1996, *Aquaculture Nutrition*, 2: 183–191; Tocher, 2010, *Aquaculture research* 41:717-732), aunque también en los ambientes dulceacuícolas la presencia de estos ácidos grasos ha sido identificada como un factor fundamental que controla las interacciones en la cadena nutricional (Müller-Navarra et al. 2000, *Nature* 403, 74-77).

Además de las aplicaciones en acuicultura, especies del género *Nannochloropsis* han sido estudiadas de forma extensiva como fuente de EPA para aplicaciones nutricionales humanas y animales (Sukenic 1998, Cohen, Z. (Ed.), *Chemicals from Microalgae*. Taylor and Francis, London, p 41-56; Chini Zitelli et al., 1999, *Journal of Biotechnology* 70: 299–312) y más recientemente, han centrado un gran interés debido al potencial de estas especies para la producción de biodiesel (Rodolfi et al., 2008, *Journal of Biotechnology* 70: 299–312; Doan, et al., 2011, *Biomass and Bioenergy* 35: 2534-2544; San Pedro et al. 2013, *Bioresource Technology* 134:353-361).

Además de las aplicaciones en acuicultura, las diversas propiedades del EPA lo convierten en un compuesto de elevado interés biotecnológico y farmacológico, de ahí el interés de la utilización de la biomasa de especies del género *Nannochloropsis*, ricas en este ácido graso insaturado, en el campo de la nutrición humana y animal. Se ha demostrado que los ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3 EPA y DHA presentan una serie de beneficios para la salud, siendo efectivos en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, incluyendo efectos bien documentados hipo-triglicémicos y anti-inflamatorios. Así mismo, varios estudios indican efectos prometedores antihipertensivos, anticancerígeno, anti-depresión, anti-envejecimiento y anti-artríticos. También se ha descrito efecto antiinflamatorio y sensibilizador a la insulina en desordenes metabólicos. De forma más específica, diversos estudios indican que el EPA puede ser beneficioso en procesos de inflamación, esquizofrenia, depresión, síndrome de fatiga crónica, disfunción hepática, síndrome de atención deficiente e hiperactividad, etc., además de mejorar la eficiencia de la quimioterapia en procesos cancerígenos (Siriwardhana et al. 2012, Se-Kwon Kim, Editor(s), Advances in Food and Nutrition Research, Academic Press, 2012, Volume 65, Pages 211-222). En sistemas de experimentación animal se ha demostrado que la inclusión de biomasa de *Nannochloropsis* rica en EPA produce una mayor proporción de DHA en los lípidos cerebrales de la progenie de ratas y también un mejor aspecto y contenido en DHA de huevos de gallinas alimentados con la biomasa de esta especie (Sukenic, 1999, Cohen, Z. (Ed.), Chemicals from Microalgae. Taylor and Francis, London, p 41-56).

Además, el enorme interés de la biomasa microalgal rica en EPA para su aplicación en el campo de la acuicultura, cría animal y tratamiento de enfermedades en humanos, derivado de las propiedades antes citadas, reviste aún mayor interés la obtención de biomasa enriquecida también en DHA. El DHA es uno de los componentes principales del aceite de pescado y además de ser fundamental en el desarrollo de especies marinas, es muy abundante en los fosfolípidos del cerebro de los mamíferos. Se ha sugerido que el DHA es necesario para el desarrollo neuronal y la plasticidad sináptica. El contenido de DHA en los fosfolípidos cerebrales también es menor en pacientes con Alzheimer. Además, el elevado contenido de DHA en la leche materna humana ha sido relacionado con el desarrollo del sistema nervioso central en niños, llevando a la recomendación de la suplementación de las leches maternizadas en este compuesto. Otras posibles aplicaciones del DHA incluyen actividad anticancerígena, psoriasis, etc. Existen además numerosos estudios que sugieren que el DHA es un componente importante para el mantenimiento y mejora de las funciones cerebrales en animales envejecidos (Sugimoto et al., 2002, Biol. Pharm. Bull 25:1090-1092). Comercialmente el DHA para uso en nutrición humana se produce a partir de aceite de pescado o del dinoflagelado heterótrofo *Cryptocodinium cohnii* (Mendes et al., 2008, Journal of Applied Phycology 21:199-214). La utilización de DHA de *C. cohnii* para el enriquecimiento de alimento, particularmente en el campo de la acuicultura, está divulgado en la patente (Gladue et al., 2002, US 6372460 B1). Aunque existen microalgas ricas en DHA, presentando un contenido que puede variar entre el 10 y el 20 % (Volkman et al. 1989, Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 128: 219-240), las especies que presentan un elevado contenido de este ácido graso presentan bajos niveles de EPA.

Por lo tanto, tanto en el campo de la acuicultura como en el campo de la nutrición animal y humana, es de gran interés la disponibilidad de biomasa microalgal enriquecida **simultáneamente** en EPA y DHA. Un producto con estas características no ha sido descrito en la bibliografía ni se encuentra en el mercado, por lo que continúa siendo un reto la obtención de una microalga enriquecida simultáneamente en EPA y DHA.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Los autores de la presente invención han desarrollado un procedimiento de enriquecimiento que permite obtener biomasa de microalgas con un elevado contenido simultáneo en ácido eicosapentaenoico (20:5n-3) (EPA) y ácido docosahexaenoico (22:6n-3) (DHA). En particular, la biomasa de microalgas pertenece al género *Nannochloropsis*.

Una ventaja de la invención es que la relación entre EPA y DHA es superior a 0,5 partes de DHA por cada 10 partes de EPA, pudiéndose alcanzar una relación de 2,4 partes de DHA por 1 parte de EPA, y siendo el porcentaje de EPA al menos un 10 % del total de los ácidos grasos de la biomasa.

Una ventaja adicional de la invención es que la biomasa de microalgas obtenida tiene además un contenido elevado en otros ácidos poliinsaturados, como por ejemplo el ácido poliinsaturado 22:5 como se muestra en las figuras 5 y 6, que supera el 10 % en peso respecto al peso del concentrado de biomasa.

Como se puede comprobar en los ejemplos y figuras, la relación de EPA y DHA obtenida al aplicar el procedimiento de esta invención es muy superior a cualquier otra descrita previamente, y así los autores de la presente invención obtuvieron una relación de hasta 2,4 partes de DHA por cada parte de EPA en presencia del emulsionante y 0,6 partes de DHA por cada parte de EPA en ausencia del mismo.

Así, en un aspecto la invención se dirige a un procedimiento para el enriquecimiento de biomasa de microalgas del género *Nannochloropsis* en ácidos poliinsaturados, que comprende:

a) mezclar i) una suspensión de biomasa de microalgas vivas del género *Nannochloropsis* en la que la relación de peso seco de microalgas es de entre el 0,1 % y el 20 % con respecto al volumen total de la suspensión, con ii) una solución o emulsión de ácidos grasos que comprende una cantidad de ácido docosahexaenoico superior al 5 % en peso respecto al total de ácidos grasos, y

b) mantener la mezcla resultante durante al menos 24 horas.

En otro aspecto, la invención se dirige a una biomasa de microalgas del género *Nannochloropsis*, caracterizada porque comprende ácido eicosapentaenoico (20:5n-3) (EPA) y ácido docosahexaenoico (22:6n-3) (DHA) en una relación en peso de DHA igual o superior a 1 parte de DHA por cada 10 partes de EPA y contiene una proporción de ácido eicosapentaenoico (20:5n-3) (EPA) de al menos un 10 % respecto al total de los ácidos grasos de la biomasa.

En otro aspecto, la invención se dirige a una biomasa de microalgas del género *Nannochloropsis*, obtenible mediante el procedimiento descrito anteriormente.

En otro aspecto, la invención se dirige al uso de la biomasa de microalgas del género *Nannochloropsis* descrita anteriormente, que tiene aplicación en la acuicultura, en la cría animal para la mejora de perfil de ácidos grasos de productos de consumo (carne, huevos, leche, etc.) y en el sector de la cosmética.

En otro aspecto la invención se dirige al uso de la biomasa de microalgas del género *Nannochloropsis* descrita anteriormente para la preparación de un nutraceutico. En particular, el nutraceutico de la presente invención es de aplicación en casos de infertilidad, enfermedades del sistema nervioso y enfermedades del sistema circulatorio, además de servir como complemento alimenticio.

Caracteriza a la presente invención el hecho de emplear en el procedimiento una biomasa concentrada en vez de cultivos diluidos, los tiempos y condiciones de exposición de la biomasa, la posibilidad de utilización de emulsionante, la modificación de la relación de biomasa y concentración de lípidos, así como el empleo de un aceite como fuente de ácidos grasos.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, de acuerdo con un ejemplo preferente de realización práctica de la misma, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un juego de dibujos en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente.

La Figura 1 muestra el perfil de ácidos grasos, medido mediante cromatografía de gases, de un concentrado celular de la microalga de agua dulce *N. limnetica* (concentración de biomasa 10 % peso/volumen) enriquecida con una emulsión de DHA puro (2,5 mg/mL) durante 6 horas en el EJEMPLO 1. Estas condiciones, que asemejan a las descritas en la bibliografía (Wacker et al., 2002) no permitieron el enriquecimiento de la biomasa en DHA, ya que se observa claramente el pico de EPA en el minuto 45, presente en la biomasa de todas las especies de *Nannochloropsis*, mientras que el pico de DHA, que aparece en el minuto 51, es prácticamente inapreciable. Tampoco se logró enriquecimiento con el aceite rico en DHA en ninguna de las concentraciones probadas.

La Figura 2 muestra el perfil de ácidos grasos, medido mediante cromatografía de gases, de un concentrado de *N. limnetica* (concentración de biomasa 1 % peso seco/volumen) no enriquecido, procedente del experimento descrito en el EJEMPLO 2, en el que solo aparece el pico de EPA característico de las especies de *Nannochloropsis*.

La Figura 3 muestra el perfil de ácidos grasos, medido mediante cromatografía de gases, de un concentrado de *N. limnetica* (concentración de biomasa 1 % peso seco/volumen) enriquecida con una emulsión de DHA puro (2,5 mg/mL) durante 24 horas procedente del experimento descrito en el EJEMPLO 2. Se observa claramente la existencia del pico correspondiente al DHA en el minuto 51, que en este caso es superior al pico del EPA, que aparece en el minuto 45.

La Figura 4 muestra cromatograma de enriquecimiento de *Nannochloropsis limnetica* en las mismas condiciones que la Figura 3, en el que el enriquecimiento se realiza utilizando un aceite rico en DHA (contenido mayor del 10 %) en el que se observa el pico correspondiente al DHA en el minuto 51, además de otros picos entre el EPA (minuto 45) y el DHA que corresponden a la incorporación de otros ácidos grasos poliinsaturados, entre los que se encuentra el 22:5.

La Figura 5 muestra el % de ácidos grasos del total en concentrados de *N. limnetica* enriquecida durante 24 horas con DHA puro o con aceite rico en DHA, ambos a una concentración de 2,5 mg/mL y en presencia de emulsionante, siguiendo el procedimiento descrito en el EJEMPLO 2.

La Figura 6 muestra el % de ácidos grasos respecto del total en concentrados de *N. limnetica* enriquecida con aceite rico en DHA a una concentración de 2,5 mg/mL durante 24 horas en presencia de emulsionante y en ausencia del mismo, siguiendo el procedimiento descrito en el EJEMPLO 2.

La Figura 7 muestra un cromatograma del perfil de ácidos grasos de la microalga marina *Nannochloropsis gaditana* no enriquecida (control), correspondiente al experimento descrito en el EJEMPLO 3, en el que se observa el pico de EPA a los 45 minutos característico de todas las especies de este género. Como era de esperar en una biomasa no enriquecida, no se aprecia pico alguno en el tiempo de retención 51 minutos, correspondiente al DHA.

La Figura 8 muestra un cromatograma del perfil de ácidos grasos de la microalga marina *Nannochloropsis gaditana* enriquecida con una emulsión de aceite rico en DHA, (EPADHAX, que contiene un porcentaje de este ácido graso del 10-18 %), correspondiente al experimento descrito en el EJEMPLO 3. La biomasa se enriqueció durante 24 horas en presencia de luz con una concentración de aceite de 2,5 mg/mL. Se observa la aparición de un pico en el minuto 51 que corresponde al DHA incorporado por la microalga.

La Figura 9 muestra un cromatograma del perfil de ácidos grasos de la microalga marina *Nannochloropsis gaditana* enriquecida con una emulsión de aceite rico en DHA, (Menhaden Oil, Sigma, CAS 8002/50/4, que contiene un porcentaje de este ácido graso del 11,9 %), correspondiente al experimento descrito en el EJEMPLO 3. La biomasa se enriqueció durante 24 horas en presencia de luz con una concentración de aceite de 2,5 mg/mL. Se observa la aparición de un pico en el minuto 51 que corresponde al DHA incorporado por la microalga.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Algunas realizaciones representan los antecedentes de la invención en algunos aspectos y se dirigen a un procedimiento para el enriquecimiento de biomasa de microalgas del género *Nannochloropsis* en ácidos poliinsaturados, que comprende:

- a) mezclar i) una suspensión de biomasa de microalgas vivas del género *Nannochloropsis* en la que la relación de peso seco de microalgas es de entre el 0,1 % y el 20 % con respecto al volumen total de la suspensión, con ii) una solución o emulsión de ácidos grasos que comprende una cantidad de ácido docosahexaenoico superior al 5 % en peso respecto al total de ácidos grasos, y
- b) mantener la mezcla resultante durante al menos 24 horas.

Las microalgas del género *Nannochloropsis* comprenden tanto especies de agua dulce, como por ejemplo *Nannochloropsis limnetica*, como especies de agua marina, como por ejemplo *Nannochloropsis gaditana*, además también comprende las especies del mismo género como por ejemplo *Nannochloropsis atomus*, *N. coccoides*, *N. maculata*, *N. oculata*, *N. granulata*, *N. oceanica* y *N. salina*.

En otra realización particular, la solución o emulsión de ácidos grasos de la etapa a) tiene una concentración de entre 10 mg/mL y 100 mg/mL. Más en particular, tiene una concentración de 50 mg/mL.

En una realización particular, el procedimiento comprende además añadir en la etapa a) una solución de emulsionante.

En una realización más particular, el emulsionante se selecciona de entre albúmina de suero bovino, dodecil sulfato de sodio, alcoholes grasos polietoxilados, sales alquílicas de amonio cuaternarias, alquil-betaínas, lecitinas de soja y huevo, goma guar, goma garrofín, alginatos, ácido fosfórico, sales de fosfato, citrato de sodio, sales de fosfato, pectina, ésteres de sacarosa, ésteres de sorbitano, celulosa y sus derivados, polientilenglicol, y mezclas de los mismos.

En otra realización particular, la solución de emulsionante tiene una concentración de entre 10 mg/mL y 100 mg/mL. Más en particular, tiene una concentración de 50 mg/mL.

En otra realización particular, la relación volumétrica entre la solución de ácidos grasos de la etapa a) ii) y la solución del emulsionante está entre 1:1 y 1:4. En otra realización particular, la relación es 1:2.

En otra realización particular, la relación de peso seco de microalgas de la etapa a) es de entre el 0,8 % y el 15 %.

En otra realización particular, la suspensión de biomasa de microalgas y la solución o emulsión de ácidos grasos se mezclan en la etapa a) en una proporción de entre 1:1 y 10:1. Más en particular la proporción es de 6:1 (volumen:volumen).

En otra realización particular, la invención con respecto a los antecedentes de la invención, en la etapa b) comprende un ciclo de al menos 12 horas de luz.

Como se ha comentado anteriormente, la invención se refiere a un procedimiento para el enriquecimiento de biomasa de microalgas del género *Nannochloropsis* en distintos ácidos grasos poliinsaturados, principalmente ácido docosahexaenoico (22:6n-3, DHA). Para ello se emplea una suspensión o emulsión de ácidos grasos. Dicha suspensión o emulsión puede ser un aceite. Así en una realización particular, la suspensión o emulsión de ácidos grasos de la etapa a) es una suspensión o emulsión de un aceite o de una mezcla de aceites.

Para la presente invención se entiende por "aceite" un líquido que comprende una mezcla de triglicéridos y ácidos grasos libres, de manera que el peso total de ácidos grasos libres es inferior al 10 %.

En el procedimiento de la presente invención, el enriquecimiento de la biomasa de microalgas del género *Nannochloropsis* se puede llevar a cabo por medio de cualquier aceite o extracto rico en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, de origen animal o microbiano.

5 En una realización particular, el aceite se selecciona de entre aceites con un porcentaje de DHA superior al 5 % en peso respecto al total de ácidos grasos, como por ejemplo aceite de pescado, como por ejemplo el aceite de arenque, aceite de hígado de bacalao o derivados hidrolizados. En una realización particular, el aceite se selecciona de aceites obtenidos de microalgas marinas con un contenido de DHA superior al 5 %.

10 En una realización particular, el aceite se selecciona de entre aceite de arenque, aceite de hígado de bacalao, aceite obtenido de microalgas marinas, o mezclas de los mismos.

En una realización particular, la invención se refiere a un procedimiento para el enriquecimiento de biomasa de microalgas del género *Nannochloropsis* en ácidos poliinsaturados, que comprende:

15 a) mezclar i) una suspensión de biomasa de microalgas vivas del género *Nannochloropsis* en la que la relación de peso seco de microalgas es de entre el 0,1 % y el 20 % con respecto al volumen total de la suspensión, con ii) una solución o emulsión de aceite que comprende una cantidad de ácido docosahexaenoico superior al 5 % en peso respecto al total de ácidos grasos, y con iii) una solución de emulsionante, y
 20 b) mantener la mezcla resultante durante al menos 24 horas.

La invención, de acuerdo con las reivindicaciones, se refiere a un procedimiento para el enriquecimiento de biomasa de microalgas del género *Nannochloropsis* en ácidos poliinsaturados, que comprende:

25 a) mezclar i) una suspensión de biomasa de microalgas vivas del género *Nannochloropsis* en la que la relación de peso seco de microalgas es de entre el 0,1 % y el 20 % con respecto al volumen total de la suspensión, con ii) una solución o emulsión de aceite que comprende una cantidad de ácido docosahexaenoico superior al 5 % en peso respecto al total de ácidos grasos, a una concentración de entre 10 mg/mL y 100 mg/mL, y con iii) una solución de emulsionante a una concentración de entre 10 mg/mL y 100 mg/mL, con la condición de que la solución o emulsión
 30 ii) y la solución iii) están en una proporción de entre 1:1 y 1:10, y
 b) mantener la mezcla resultante durante al menos 24 horas, en las que al menos 12 horas son de iluminación.

En una realización particular, las emulsiones, soluciones y suspensiones del procedimiento se preparan empleando agua, disolventes alcohólicos, disolventes glicólicos, o mezclas de los mismos. En una realización particular, se emplea etanol.

La biomasa de microalgas de *Nannochloropsis* una vez enriquecida puede tener diferentes formas de presentaciones: concentrado refrigerado o congelado, biomasa seca, liofilizada o preservada por cualquier otro método, así como los extractos derivados.

Así, en una realización particular la invención se dirige a una solución, composición o liofilizado que comprende la biomasa de la invención.

Las aplicaciones de la biomasa de *Nannochloropsis* enriquecida en DHA y otros ácidos grasos poliinsaturados, preferentemente EPA son: nutrición animal en el campo de la acuicultura y otros como avicultura, ganado bovino, ovino, porcino, etc. sin restringirse a éstos, así como suplemento nutritivo en piensos para animales de compañía, además de tener aplicaciones en el sector de la cosmética.

En otro aspecto la invención se refiere a un complemento nutricional o ingrediente funcional que comprende la biomasa de la presente invención.

50 Con el procedimiento objeto de la invención se mejoran los índices de enriquecimiento de DHA establecidos para *Chlorella* y *N. limnetica*, manteniendo un elevado enriquecimiento en EPA. Para el establecimiento de la metodología se estudiaron las siguientes variables:

55 - Utilización de biomasa concentrada en vez de los cultivos diluidos utilizados en otras metodologías. En los ejemplos de enriquecimiento exitoso que se muestran se utilizan concentrados microalgales de 1 % de relación peso/volumen, mientras que en la bibliografía el concentrado utilizado para el enriquecimiento con ácidos grasos puros es 50 veces diluido (0,01 % de peso de carbono, lo que equivaldría a 0,02 % peso/volumen, (Wacker et al. 2002, Limnol. Oceanogr. 47:1242-1248).

60 - Modificación del tiempo y condiciones de exposición de la biomasa. En la presente invención se expone la mezcla durante un mínimo de 24 horas en condiciones de iluminación, siendo la presencia de iluminación un factor clave para el enriquecimiento, mientras que en la bibliografía el tiempo de exposición es de 4 horas sin especificar la presencia o no de iluminación.

65 - Modificación de la relación concentrado/dilución lipídica en etanol. En la invención se utilizan relaciones concentrado acuoso/lípido en solución etanólica de 6:1 (una parte de solución etanólica por cada seis de

concentrado microalgal acuoso), mientras que en la bibliografía se utilizan proporciones de solución etanólica mucho menores (100:1, es decir, 1 parte de etanol por cada 100 partes de concentrado microalgal acuoso)

- Modificación de la relación biomasa de microalga: concentración de lípidos. Se obtienen enriquecimientos con una concentración de aceite de 2.5 mg por mililitro de mezcla, mientras que en la bibliografía se utilizan 0.025 mg de lípido por mililitro de mezcla (Wacker et al., 2002, *Limnol. Oceanogr.* 47:1242-1248)

- Modificación de la presencia de emulsionante. En la bibliografía se utiliza emulsionante en una concentración 0.5 mg por mililitro de la mezcla. En este procedimiento se utiliza una concentración de 5 mg por mililitro de mezcla, consiguiéndose también enriquecimiento en ausencia del mismo.

- Modificación de la fuente de ácido graso utilizada. En la bibliografía el enriquecimiento significativo se consigue con ácidos grasos puros o sus sales (Hayashi et al., 2001, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65:202-204; Wacker et al., 2002, *Limnol. Oceanogr.* 47:1242-1248) mientras que en la presente invención se utilizan aceites.

En una realización preferente de la invención, el procedimiento comprende las etapas de:

- preparación de una solución de lípidos en etanol o de una emulsión lípidos junto con el emulsionante, que en el ejemplo que se cita es albúmina de suero bovino (BSA) que comprende las etapas de:

- Preparar una solución madre o stock de lípido con aceite ricos en DHA en etanol,

- Preparar una solución madre o stock de emulsionante en H₂O,

- Formar una emulsión mediante mezcla de la solución madre o stock de lípido y la solución de emulsionante en una proporción 1:2, agitando hasta que se forme una emulsión,

- preparación de la biomasa concentrada mediante centrifugado,

- enriquecimiento de la biomasa concentrada añadiendo la solución etanólica del aceite o su emulsión a la biomasa concentrada,

- dejar la mezcla expuesta durante al menos 24 horas con iluminación.

Gracias al procedimiento descrito se consigue:

• Un enriquecimiento de la biomasa de *Nannochloropsis* en DHA y otros ácidos grasos poliinsaturados utilizando aceites en vez de ácidos grasos libres. El enriquecimiento se consigue también en ausencia del emulsionante, aunque la presencia del mismo aumenta la efectividad.

• Mejora los índices de enriquecimiento de DHA establecidos para *Chlorella*, manteniendo un elevado contenido en EPA, ya presente de forma natural en la biomasa de las microalgas del género *Nannochloropsis*, modificando variables como concentración de biomasa del concentrado microalgal, tiempo de exposición, relación biomasa:ácido graso, suministro de iluminación y relación concentrado microalgal acuoso: solución lipídica etanólica

• Se obtiene una biomasa enriquecida de forma simultánea en EPA y DHA, a diferencia del procedimiento descrito por Wacker et al., (2002, *Limnol. Oceanogr.* 47:1242-1248) obteniendo relaciones EPA:DHA mayores de 10:1 (1 parte de DHA por cada 10 partes de EPA) en peso en todos los casos y alcanzándose relaciones 1:2,4 (2,4 partes de DHA por cada parte de EPA)

• El proceso de enriquecimiento es viable para especies de *Nannochloropsis* agua dulce y agua marina

A lo largo de la descripción y de las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1. En este ejemplo se probaron condiciones semejantes a las descritas en la bibliografía para el enriquecimiento de *N. limnetica*, utilizando DHA puro y un aceite de pescado con elevado contenido en DHA, no consiguiéndose enriquecimiento de la biomasa concentrada de la microalga en DHA; lo que demuestra que la modificación simple de las condiciones existentes en la bibliografía no permite el enriquecimiento.

Para la realización del experimento se preparó un concentrado de la microalga de agua dulce *N. limnetica* obtenido por centrifugación como se describe en Freire et al. (2013, *Aquaculture Conference 2013: Celebrating 40 Years of Aquaculture – Noviembre, 2013, Gran Canaria (España)*). Las células se resuspendieron en agua destilada para alcanzar una concentración de aproximadamente de $12,3 \times 10^9$ células/mL y una concentración de carbono de 50 mg/mL (equivalente a 100 mg/mL o 10 % en relación peso/volumen, teniendo en cuenta un contenido de carbono de la biomasa del 50 %). La biomasa se mezcló con una solución de DHA puro en etanol a dos concentraciones: 250 y 2500 microgramos/mL y aceite de pescado con alto contenido en Omega 3 (DHA 20-26 % EPA 7-12 %), refinado EPADHAX obtenido de la empresa Epadhax S.L.U (Boiro, A Coruña, <http://www.epadhax.eu/epadhax-omega-3-activo.php>) a una concentración de 25 y 250 microgramos/mL. En todos los casos los lípidos se emulsionaron con BSA. Las mezclas se incubaron durante 6 horas con la emulsión lipídica en agitación a una temperatura de 22 °C. Para la evaluación del grado de enriquecimiento de las pastas, una vez finalizado el periodo de incubación se

centrifugó la biomasa y se realizaron dos lavados con agua destilada para eliminar cualquier resto de lípido emulsionado que no hubiese sido incorporado por las células. Los lípidos totales fueron extraídos siguiendo el método propuesto por Bligh & Dyer (1959, Can J Biochem Physiol 37: 911-917). Los ácidos grasos fueron analizados mediante transmetilación con HCl y CH₃OH (Sato & Murata 1988, Beiheft Nova Hedwigia 112:391-405). La cuantificación e identificación se realizó mediante cromatografía de gases.

Los resultados de este primer experimento fueron negativos, no lográndose obtener enriquecimiento en DHA de la biomasa (Figura 1). En esta figura 1, correspondiente al concentrado incubado con la emulsión de DHA puro a una concentración de 250 microgramos/mL, se observa el pico correspondiente al EPA, que aparece en el cromatograma a los 45 minutos, y es característico de las especies de *Nannochloropsis*. Mientras que el pico de DHA, que aparece con tiempo de retención aproximado de 51 minutos, es prácticamente inapreciable, no habiéndose logrado por lo tanto enriquecimiento.

EJEMPLO 2. En este experimento se variaron factores como concentración de biomasa y tiempo de exposición con respecto a las condiciones descritas en el Ejemplo 1, lográndose la incorporación de DHA, tanto con la utilización de DHA puro como con la utilización del aceite rico en DHA con y sin emulsionante. Para la realización del experimento se utilizó un concentrado microalgal de *N. limnetica* obtenido por centrifugación tal y como se indica en el Ejemplo 1. En esta ocasión las células se resuspendieron en agua destilada para alcanzar una concentración de 10 mg/mL peso/volumen (1 % de relación peso:volumen, equivalente a aprox. $1,23 \cdot 10^9$ células/mL). El concentrado de microalgas se mezcló con DHA o con aceite rico en DHA a una concentración de 2,5 mg de lípido/mL emulsionados con BSA. La emulsión se preparó mezclando 50 microlitros de una dilución en etanol del lípido, a una concentración de 50 mg/ml con 100 microlitros de una solución acuosa de BSA a una concentración de 50 mg/mL. La mezcla se agitó para formar la emulsión y se añadió a 850 microlitros de concentrado microalgal. En el caso del aceite, se probó también la adición directa de la solución de aceite en etanol (50 microlitros) al concentrado, sin la mezcla previa con el emulsionante. La mezcla lípido/concentrado microalgal se incubó en agitación en presencia de luz durante 24 horas. En el caso del DHA puro, se incubó también una mezcla durante 48 horas para comprobar el efecto del enriquecimiento durante periodos aún más prolongados. Una vez finalizado el periodo de enriquecimiento la biomasa se centrifugó y lavó 2 veces, analizándose por cromatografía de gases el perfil de ácidos grasos del extracto lipídico, según la metodología descrita en el ejemplo 1.

En la Figura 2 se muestra el cromatograma de *N. limnetica* no enriquecida (control), en la que solo aparece EPA, cuyo pico se identifica a los 45 minutos, con ausencia, como era de esperar en este concentrado control, del pico de DHA. Por el contrario, la adición de 2,5 mg/mL de la emulsión de DHA puro (Figura 3) o de la emulsión de aceite rico en DHA (Figura 4) produce la incorporación del DHA, con la aparición de un pico característico a los 51 minutos. Además, cuando se utiliza el aceite rico en DHA, a mayores de cantidades elevadas de EPA y DHA, se detectan otros picos correspondientes a otros ácidos grasos poliinsaturados entre el EPA y el DHA, que no aparecen ni en el control ni en la muestra enriquecida con DHA puro.

Los valores obtenidos como % de los ácidos grasos totales y como contenido celular en peso (pg por célula), con los distintos protocolos de enriquecimiento se muestran en la Tabla 1 que muestra el perfil de ácidos grasos de concentrado de *N. limnetica* enriquecida con DHA puro durante 24 y 48 horas, y con aceite rico en DHA (EPADHAX) con y sin emulsionante (BSA en este ejemplo) durante 24 horas.

Tabla 1. Perfil de ácidos grasos de la biomasa de *Nannochloropsis limnetica* no enriquecida (control) o enriquecida con DHA puro y aceite rico en DHA (EPADHAX) a una concentración de 2,5 mg/mL, en ambos casos emulsionados con BSA. El enriquecimiento se realizó durante 24 y 48 horas en el caso del DHA, y durante 24 horas en el caso de los enriquecimientos con el aceite. En este último caso se probó también el efecto de retirar el BSA como emulsionante (Aceite1-BSA).

Ácidos grasos	Control		DHA24h		DHA48h	
	%	pg/cel	%	pg/cel	%	pg/cel
14:0	4,08	0,02	2,17	0,03	2,49	0,02
16:0	23,99	0,14	9,89	0,11	12,16	0,12
16:1	19,46	0,11	8,19	0,09	9,29	0,09
18:0	1,38	0,01	0,42	0,00	0,48	0,00
18:1n9c	1,26	0,01	0,36	0,00	1,17	0,01
18:1n9t	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

ES 2 712 298 T3

18:2n6	5,57	0,03	2,46	0,03	2,71	0,03
18:4n3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
20:3n3	7,69	0,04	3,35	0,04	3,74	0,04
20:5n3	36,57	0,21	15,85	0,18	17,97	0,18
24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
22:5	0,00	0,00	0,75	0,01	0,77	0,01
22:6n3	0,00	0,00	56,56	0,65	49,22	0,49
EPA/DHA	-	-	0,28	-	0,36	-

Ácidos grasos	ACEITE 1 + BSA		ACEITE 1 - BSA	
	%	pg/cel	%	pg/cel
14:0	2,41	0,03	3,99	0,04
16:0	13,26	0,17	22,65	0,22
16:1	8,44	0,11	13,20	0,13
18:0	1,31	0,02	2,90	0,03
18:1n9c	5,00	0,06	11,38	0,11
18:1n9t	0,00	0,00	0,00	0,00
18:2n6	2,12	0,03	3,62	0,04
18:4n3	0,00	0,00	0,00	0,00
20:3n3	7,40	0,10	5,36	0,05
20:5n3	13,42	0,17	22,65	0,22
24:0	0,00	0,00	0,00	0,00
22:5	12,73	0,16	0,61	0,01
22:6n3	33,92	0,44	13,65	0,13
EPA/DHA	0,40	-	1,66	-

5 La comparación de los enriquecimientos de 24 horas con DHA puro y con aceite rico en DHA (EPADHAX) (Tabla 1, Figura 5) muestra un mayor porcentaje de DHA cuando éste se adiciona puro (56,6 %) frente al aceite de poliinsaturados (33,9 %). Sin embargo, en la muestra enriquecida con el aceite (Tabla 1 Figura 6) se encuentra un elevado porcentaje de otros ácidos grasos poliinsaturados, como el ácido graso 22:5 (12,7 %). Estos valores de contenido de DHA por célula equivalen a 80,70 microgramos de DHA por mg de peso seco en el caso del enriquecimiento con DHA puro y a 52 microgramos de DHA por miligramo de peso seco en el caso del EPADHAX. Estos valores son significativamente más altos que los obtenidos por Wacker et al. (Wacker et al. 2012, Limnol. Oceanogr. 47:1242-1248), que reporta unos 11,6 microgramos de DHA por miligramo de biomasa. El tiempo de enriquecimiento óptimo se estableció en 24 horas, ya que el análisis de las muestras enriquecidas con DHA puro 10 reveló que los enriquecimientos de 48 horas no mejoraron los niveles de EPA o DHA (Tabla 1).

El análisis del perfil de ácidos grasos de las muestras enriquecidas con DHA puro demuestran que éste alcanza el 56 % del total de ácidos grasos con 24 horas de enriquecimiento, no mejorando este valor con enriquecimiento de 48 horas (Tabla 1).

5 La presencia del emulsionante mejora claramente la incorporación del DHA y otros ácidos grasos poliinsaturados presentes en el aceite (Tabla 1, Figura 6), pero aún en ausencia del emulsionante el DHA alcanza el 13,65 % del total de los ácidos grasos, con una relación 1,66 EPA/DHA (Tabla 1).

10 **EJEMPLO 3.** En este experimento se probó la eficiencia del procedimiento de enriquecimiento con dos especies distintas: la especie de agua dulce *Nannochloropsis limnetica* y la especie marina *Nannochloropsis gaditana*. Se prepararon concentrados mediante centrifugación de las células mediante la metodología descrita en los Ejemplos 1 y 2. Las células de *N. limnetica* y *N. gaditana* se resuspendieron en agua destilada o agua de mar respectivamente a una concentración del 1 % peso/volumen. El enriquecimiento, siguiendo el procedimiento y concentraciones descritas en el Ejemplo 2, se realizó con una emulsion en BSA de dos tipos de aceites ricos en DHA: aceite EPADHAX, utilizado en el ejemplo 2 (aceite 1) y aceite de arenque (Menhaden Oil, Sigma, CAS 8002/50/4) con una concentración final de 2,5 mg/mL (aceite 2). Ambos aceites se caracterizan por poseer porcentajes de DHA del 10-18 % en el caso del EPADHAX y 8-15 % en el caso del aceite de arenque. El contenido de ácidos grasos libres en el aceite 1 ronda los 14 mg por gramo de aceite, mientras que los valores descritos en la bibliografía para el aceite 2 son menores, alrededor de 5,5 mg por gramo. Es importante hacer notar que debido a el origen natural de estos aceites, la composición de ácidos grasos y el porcentaje de ácidos grasos libres puede variar entre distintas partidas. Los enriquecimientos se llevaron a cabo por triplicado. Una vez finalizadas las 24 horas de exposición, las células se concentraron por centrifugación, se lavaron dos veces con agua destilada y se analizaron mediante la metodología descrita en los ejemplos 1 y 2.

25 El perfil de ácidos grasos de las células de *N. limnetica* y *N. gaditana* no enriquecidas y enriquecidas con los dos aceites ricos en DHA (aceite 1 y aceite 2) se muestran en las Tablas 2 y 3 respectivamente. En este experimento se han logrado alcanzar contenidos de DHA de entre el 1,5 y el 2,8 % de los ácidos grasos totales de la biomasa, independientemente de la especie y del aceite utilizado. En todos los casos hay una relación mínima de 1 parte de DHA por cada 10 partes de EPA. Las figuras 7, 8 y 9 muestran los perfiles cromatográficos de *N. gaditana* no enriquecida (Figura 7) y enriquecida con los dos tipos de aceites ricos en DHA. En estas dos últimas figuras se aprecia claramente el pico de DHA a los 51 minutos, resultante de la incorporación de los aceites..

35 Tabla 2. Perfil de ácidos grasos de la especie de agua dulce *N. limnetica* no enriquecida (Control) y enriquecida durante 24 horas con dos tipos de aceites ricos en ácidos grasos poliinsaturados añadidos al concentrado celular en forma de emulsión a una concentración de 2,5 mg/mL.

	Control		Aceite 1		Aceite 2	
	%	pg/célula	%	pg/célula	%	pg/célula
14:0	6,20	0,01	4,79 ± 0,74	0,03 ± 0,01	6,01 ± 3,22	0,01 ± 0,01
16:0	24,48	0,04	4,79 ± 0,74	0,03 ± 0,01	31,01 ± 2,99	0,06 ± 0,01
16:1	25,68	0,04	18,55 ± 4,05	0,12 ± 0,07	16,14 ± 8,16	0,03 ± 0,03
18:0	-	-	2,15 ± 2,74	0,02 ± 0,02	-	-
18:1n9	1,65	0,00	1,97 ± 0,78	0,01 ± 0,00	2,45 ± 0,65	0,00 ± 0,00
18:2n6	9,80	0,01	9,07 ± 5,63	0,06 ± 0,05	12,86 ± 2,32	0,03 ± 0,00
20:1n9	2,99	0,00	2,05 ± 0,03	0,01 ± 0,01	2,87 ± 0,41	0,01 ± 0,00
20:3n3	4,93	0,01	2,76 ± 0,61	0,02 ± 0,01	4,20 ± 0,66	0,01 ± 0,00
20:5n3(EPA)	21,18	0,03	10,43 ± 3,04	0,06 ± 0,03	18,65 ± 3,06	0,04 ± 0,00
22:6n3 (DHA)	-	-	1,54 ± 1,05	0,01 ± 0,01	1,84 ± 0,69	0,00 ± 0,00
EPA/DHA	-	-	6,77	--	10,14	-

40 Tabla 3. Perfil de ácidos grasos de la especie de agua dulce *N. gaditana* no enriquecida (Control) y enriquecida durante 24 horas con dos tipos de aceites ricos en ácidos grasos poliinsaturados añadidos al concentrado celular en forma de emulsión a una concentración de 2,5 mg/mL.

	Control		Aceite 1		Aceite 2	
	%	pg/célula	%	pg/célula	%	pg/célula
14:0	4,08	0,02	6,17 ± 1,24	0,03 ± 0,02	6,05 ± 3,16	0,07 ± 0,05
16:0	23,99	0,14	29,02 ± 5,26	0,12 ± 0,06	31,54 ± 3,73	0,50 ± 0,37
16:1	19,46	0,11	14,02 ± 2,03	0,05 ± 0,02	16,29 ± 7,98	0,24 ± 0,17
18:0	1,38	0,01	2,81 ± 0,67	0,01 ± 0,00	2,50 ± 0,71	0,04 ± 0,03
18:1n9	0,00	0,00	12,58 ± 1,79	0,05 ± 0,03	11,54 ± 1,50	0,17 ± 0,11
18:2n6	5,57	0,03	3,12 ± 0,45	0,01 ± 0,01	2,92 ± 0,50	0,05 ± 0,04
20:1n9	0,00	0,00	1,51 ± 0,54	0,01 ± 0,00	0,58 ± 0,22	0,01 ± 0,01
20:3n3	7,69	0,04	4,20 ± 0,86	0,02 ± 0,01	4,27 ± 0,79	0,07 ± 0,06

20:5n3(EPA)	36,57	0,21	21,23 ± 6,60	0,09 ± 0,04	19,00 ± 3,65	0,31 ± 0,26
22:6n3 (DHA)	0,00	0,00	2,80 ± 1,14	0,01 ± 0,00	1,88 ± 0,75	0,03 ± 0,03
EPA/DHA	-	-	7,59	-	10,11	-

Como resultado de todas las experimentaciones mostradas, se considera que un procedimiento preferente pero no limitativo de enriquecimiento de biomasa de microalgas del género *Nannochloropsis* en distintos ácidos grasos, principalmente EPA, y DHA comprende las etapas de:

- 5
- Preparación de una suspensión etanólica de lípidos o ácidos grasos o de una emulsión lípidos o ácidos grasos + emulsionante (BSA, bovine serum albumin u otro) que comprende a su vez:
 - Preparar una solución madre o stock de lípido (que puede ser preferentemente EpaDhax¹⁵⁰ o DHA, Sigma D-2534 u otro aceite rico en DHA) en etanol, a una concentración de 50 µg/µL.
 - 10 - Preparar una solución madre stock de BSA, que preferentemente puede ser Sigma A4503, u otro emulsionante en H₂O destilada, a una concentración de 50 mg/mL.
 - preparar una mezcla madre o stock de lípido / ácido graso puro y BSA en una proporción 1:2. Agitar hasta que se forme la emulsión.
 - 15 - Preparación del concentrado de biomasa mediante centrifugado u otro procedimiento de concentración como por ejemplo sedimentación, floculación, filtración tangencial, etc., para obtener una concentración final de 10 mg/mL o mayor, a la que se añade la emulsión previamente preparada. El procedimiento se puede llevar a cabo con diferentes concentraciones de biomasa
 - 20 - Enriquecimiento del concentrado de biomasa mediante el añadido directo de la solución madre de lípidos en etanol o de la emulsión lípido+ emulsionante (BSA u otro) al concentrado de microalgas
 - Dejar la mezcla en agitación constante durante 24 horas en presencia de luz.

25 En una posible forma de realización se podría añadir 150 µL de emulsión (lípidos+ emulsionante) a 850 µL de concentrado microalgal, lo que representa una proporción aproximada de 1:6, o cualquier combinación volumétrica que mantenga esa proporción.

30 En otra posible forma de realización se añadirían 50 µL de una solución lipídica en etanol a 950 µL de concentrado microalgal, lo que representa una proporción aproximada de 1:20, o cualquier combinación volumétrica que mantenga esa proporción.

El tiempo de agitación constante de la mezcla puede ser con un ciclo de 12h de luz, 12h de oscuridad.

35 Gracias al procedimiento descrito y a los ensayos realizados se pone de manifiesto que la aplicación de las condiciones descritas en la bibliografía no resulta efectiva para la obtención de enriquecimiento en las suspensiones concentradas de microalgas, independientemente de la fuente de ácido graso utilizada, que solo puede ser conseguido mediante las condiciones y compuestos descritos en la invención.

40 Descrita suficientemente la naturaleza de la presente invención, así como la manera de ponerla en práctica, se hace constar que, dentro de su esencialidad, podrá ser llevada a la práctica en otras formas de realización que difieran en detalle de la indicada a título de ejemplo, y a las cuales alcanzará igualmente la protección que se recaba, siempre que no altere, cambie o modifique su principio fundamental.

Referencias

- 45 Ahn, Y.J., Kim, G.J., Kim, J.E., Kim, Y.H., Ko, M.S. Yun, S.Y. 2005. Process for producing *Chlorella* containing omega-3 fatty acids including eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), comprises adding EPA and DHA monoglycerides to the culture medium at the end of fermentation. KR2005015233-A; KR768757-B1
- Aragão C., Conceição L.E.C., Dinis M.T., Fyhn H-J. 2004. Amino acid pools of rotifers and Artemia under different conditions: nutritional implications for fish larvae. *Aquaculture* 234: 429-445.
- 50 Basen, T., Rothhaupt, K.-O., Martin-Creuzburg, D. 2012. Absence of sterols constrains food quality of cyanobacteria for an invasive freshwater bivalve. *Oecologia* 170:57-64.
- Bentley CD, Carroll PM, Watanabe WO 2008 Intensive rotifer culture in a pilot-scale continuous recirculating system using nonviable microalgae and an ammonia neutralizer. *J World Aquac Soc* 39:625–635
- 55 Bligh E.G., Dyer W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37: 911-917.
- Chini Zittelli, G. Lavista, F., Bastianini, A., Rodolfi, L., Vincenzini, M., Tredici, M.R.. 1999. Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis* sp. cultures in outdoor tubular photobioreactors. *Journal of Biotechnology* 70: 299–312
- 60 CHLORELLA KOGYO CO. LTD. 1999. Production of *Chlorella* containing highly unsaturated fatty acids - comprises culture of *Chlorella* in medium containing DHA and other highly unsaturated fatty acids in free acid or salt form. JP10276684-A; KR98080312-A; JP3096654-B2; KR428732-B; KR423876-B.

- Doan T.T.Y., Sivaloganathan B., Obbard J.P. 2011. Screening of marine microalgae for biodiesel feedstock. *Biomass and Bioenergy* 35: 2534-2544.
- Ferreira, M., Coitinho, P., Seixas, P., Fábregas, J., Otero, A. 2009. Enriching rotifers with "premium" microalgae. *Nannochloropsis gaditana*. *Mar Biotechnol* 11:585-595.
- 5 Freire, I., Cortina, A., Barreiro, P., Llamas B., Otero, A. 2013. *Nannochloropsis limnetica*: a new freshwater microalgal species for marine aquaculture. *Aquaculture Conference 2013: Celebrating 40 Years of Aquaculture – Noviembre, 2013, Gran Canaria (España)*.
- Gladue, R.M., Behrens, P.W. 2002. DHA-containing nutritional compositions and methods for their production. US 6372460B1.
- 10 Hayashi, M., Yukino, T. Maruyama, I., Kido, S., Kitaoka, S. 2001. Uptake and accumulation of exogenous docosahexaenoic acid by *Chlorella*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65:202-204.
- Hibberd, D.J. 1981. Notes of the taxonomy and nomenclatures of the algal classes Eustigmatophyceae and Trbophyceae (synom Xanthophyceae). *Bot J Linnean Society* 82:93-119.
- Hibberd, D.J. Leedale G.F. 1972. Observations on the cytology and ultrastructure of the new algal class, Eustigmatophyceae. *Annals of Botany* 36:49-71.
- 15 Hirayama, K., Nakamura, K. 1976. Fundamental studies on the physiology of rotifers in mass culture- V. Dry Chlorella powder as a food for rotifers. *Aquaculture* 8:301-307.
- Izquierdo, M.S. 1996 Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae. *Aquaculture Nutrition*, 2: 183–191.
- 20 Jeffrey, S.W., Vesk, M. 1997. Introduction to marine phytoplankton and their pigment signatures. En: *Phytoplankton pigments in oceanography*. S.W. Jeffrey, R.F.C. Mantoura, S.W. Wright (eds). UNESCO Publishing Paris, pp 37-84.
- Kobayashi, T., Nagase, T., Hino, A., Takeuchi, T. 2008. Effect of combination feeding of *Nannochloropsis* and freshwater *Chlorella* on the fatty acid composition of rotifer *Brachionus plicatilis* in a continuous culture. *Fisheries Sci* 74:649-656.
- 25 Koiso M, Yoshikawa M, Kuwada H, Hagiwara A (2009) Effect of maternal diet on survival and life history parameters of next generations in the rotifers *Brachionus plicatilis* sp. complex. *Nippon Suisan Gakk* 75:828–833
- Krienitz, L., Hepperle, D., Stich, H.-B. Weiler, W. 2000. *Nannochloropsis limnetica* (Eustigmatophyceae), a new species of picoplankton from freshwater. *Phycologia* 39:219-227.
- Krienitz, L., Manfred, W. 2006. The high content of polyunsaturated fatty acids in *Nannochloropsis limnetica* (Eustigmatophyceae) and its implication for food web interactions, freshwater aquaculture and biotechnology. *Limnologia* 36:204-210.
- 30 Lubian, L.M., Establier, R. 1982. Estudio comparativo de la composición de pigmentos de varias cepas de *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae). *Investigación Pesquera* 46:379-389.
- Luzbens, E., Gibson, O., Zmora, O., Sukenik, A. 1995. Potential advantages of frozen algae (*Nannochloropsis* sp.) for rotifer (*Brachionus plicatilis*) culture. *Aquaculture* 133:295-309.
- 35 Maruyama, I., Nakamura, T., Matsubayashi, T., Ando, Y., Maeda, T. 1986. Identification of the alga known as "marine *Chlorella*" as a member of the Eustigmatophyceae. *Jap. J. Phycol.* 34:319-325.
- Maruyama, I., Ando, Y., Maeda, T., Hirayama, K. 1989. Uptake of vitamin B12 by various strains of unicellular algae *Chlorella*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55:1785-1790.
- 40 Maruyama, I., Hirayama, K. 1993. The culture of the rotifer *Brachionus plicatilis* with *Chlorella vulgaris* containing Vitamin B12 in its cells. *Journal of the World Aquaculture Society* 24:194-198.
- Maruyama, I., Nakao, I., Shigueno, Y., Ando, Y., Hirayama, K., 1997. Application of unicellular algae *Chlorella vulgaris* for the mass culture of marine rotifer *Brachionus*. *Hydrobiologia* 358: 133–138.
- Mendes, A., Reis, A., Vasconcelos, R., Guerra, P., Lopes da Silva, T. 2008. Cryptocodinium cohnii with emphasis on DHA production: a review. *Journal of Applied Phycology* 21:199-214.
- 45 Müller-Navarra, D. C., Brett, M. T., Liston, A. M and Goldman, C. R. 2000. A highly unsaturated fatty acid predicts carbon transfer between primary producers and consumers. *Nature* 403, 74-77.
- Nuria Navarro, N., Yúfera, M. García-Gallego, M. 2001. Use of freeze-dried microalgae for rearing gilthead seabream, *Sparus aurata* L., larvae. II. Biochemical composition. *Hydrobiologia* 452: 69–77
- 50 Rodolfi, L., Chini Zitelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M.R. 2008. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipids synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol Bioeng* 102:100-112.
- San Pedro, A., González-López, C.V., Ación, F.G., Molina-Grima, E. 2013. Marine microalgae selection and culture conditions optimization for biodiesel production. *Bioresource Technology* 134:353-361.
- 55 Santos, L.M. 1996. The Eustigmatophyceae: actual knowledge and Research perspectives. *Beiheft Nova Hedwigia* 112:391-405.
- Sato N., Murata. 1988. Membrane lipids. In: Packer L., Glazer A.N. (Eds) *Methods Enzimol.* Vol. 167. Academic Press, New York, 251-259.
- Siriwardhana, N. Kalupahana, N.S., Moustaid-Moussa, N. 2012. Health Benefits of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids: Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid, In: Se-Kwon Kim, Editor(s), *Advances in Food and Nutrition Research*, Academic Press, 2012, Volume 65, Pages 211-222.
- 60 Srivastava A, Hamre K, Stoss J, Chakrabarti R, Tonheim SK (2006) Protein content and amino acid composition of the live feed rotifer (*Brachionus plicatilis*): with emphasis on the water soluble fraction. *Aquaculture* 254:534–543
- Sugimoto, Y., Taga, C., Nishiga, M., Fujiwara, M., Konishi, F., Tanaka, K., Kamei, C. 2002. Effect of docosahexaenoic acid-fortified *Chlorella vulgaris* strain CK22 on the radial maze performance in aged mice. *Biol. Pharm. Bull* 25:1090-1092.
- 65

- Sukenik, A., 1999. Production of eicosapentaenoic acid by the marine eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. In: Cohen, Z. (Ed.), Chemicals from Microalgae. Taylor and Francis, London, p 41-56
- Sukenik, A., Zmora, O., Carmeli, Y. 1993. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. II. *Nannochloropsis* sp. Aquaculture 117:313-326.
- 5 Tocher, D.R. 2010. Fatty acid requirements on ontogeny of marine and freshwater fish. Aquaculture research 41:717-732.
- Volkman, J.K., Jeffrey, S.W., Nichols, P.D., Rogers, G.I., Garland, C.D. 1989. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture, Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 128: 219-240.
- 10 Wacker, A., Becher, P., von Elert, E. 2002. Food quality effects of unsaturated fatty acids on larvae of the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. Limnol. Oceanogr. 47:1242-1248.
- Wacker, A., Martin-Creuzburg, M. 2007. Allocation of essential lipids in *Daphnia magna* during exposure to poor food quality. Functional ecology 21:738-747.
- Wacker, A., von Elert, E. 2003. Food quality controls reproduction of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). Oecologia 135:332-338.
- 15 Watanabe, T., Kitayama, C., Fujita, S. 1983. Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. Aquaculture 34:115-143.
- Whittle, S.J., Casselton, P.J. 1975. The chloroplast pigments of the algal classes Eustigmatophyceae and Xantophyceae. I. Eustigmatophyceae. British Phycological Journal 10:179-191.
- 20 Yoshimura K, Tanaka K, Yoshimatsu T. 2003. A novel culture system for the ultra-high-density production of the rotifer, *Brachionus rotundiformis*—a preliminary report. Aquaculture 227:165–172.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para el enriquecimiento de biomasa de microalgas en ácidos grasos poliinsaturados del género *Nannochloropsis* que comprende
- 5 a) mezclar i) una suspensión de biomasa de microalgas vivas del género *Nannochloropsis* en la que la relación de peso seco de microalgas es de entre el 0,1 % y el 20 % con respecto al volumen total de la suspensión, con ii) una solución o emulsión de ácidos grasos que comprende una cantidad de ácido docosahexaenoico superior al 5 % en peso respecto al total de ácidos grasos, y
- 10 b) mantener la mezcla resultante durante al menos 24 horas en presencia de luz.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, donde la solución o emulsión de ácidos grasos de la etapa a) tiene una concentración de entre 10 mg/mL y 100 mg/mL.
3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además añadir en
- 15 la etapa a) una solución de emulsionante.
4. Procedimiento según la reivindicación 3, donde el emulsionante se selecciona de entre albúmina de suero bovino, dodecil sulfato de sodio, alcoholes grasos polietoxilados, sales alquílicas de amonio cuaternarias, alquil-betaínas, lecitinas de soja y huevo, goma guar, goma garrofín, alginatos, ácido fosfórico, sales de fosfato, citrato de sodio, sales de fosfato, pectina, ésteres de sacarosa, ésteres de sorbitano, celulosa y sus derivados,
- 20 polientilenglicol, y mezclas de los mismos.
5. Procedimiento según las reivindicaciones 3 o 4, donde la solución de emulsionante tiene una concentración de entre 10 mg/mL y 100 mg/mL.
- 25 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, donde la relación entre la solución o emulsión de los ácidos grasos de la etapa a) ii) y la solución del emulsionante está entre 1:1 y 1:4.
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la relación de peso seco de
- 30 microalgas de la etapa a) es de entre el 0,8 % y el 15 %.
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la suspensión de biomasa de microalgas y la solución o emulsión de ácidos grasos se mezclan en la etapa a) en una proporción de entre 1:1 y 10:1.
- 35 9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la etapa b) comprende un ciclo de al menos 12 horas de luz.
10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende:
- 40 a) mezclar i) una suspensión de biomasa de microalgas vivas del género *Nannochloropsis* en la que la relación de peso seco de microalgas es de entre el 0,1 % y el 20 % con respecto al volumen total de la suspensión, con ii) una solución o emulsión de aceite que comprende una cantidad de ácido docosahexaenoico superior al 5 % en peso respecto al total de ácidos grasos, a una concentración de entre 10 mg/mL y 100 mg/mL, y con iii) una solución de emulsionante a una concentración de entre 10 mg/mL y 100 mg/mL, con la condición de que la solución o emulsión
- 45 ii) y la solución iii) están en una proporción de entre 1:1 y 1:10, y
- b) mantener la mezcla resultante durante al menos 24 horas, en las que al menos 12 horas son de iluminación.
11. Procedimiento según la reivindicación 10 caracterizado porque:
- 50 - la emulsión o solución de aceite es una solución de lípido en etanol, a una concentración de 50 µg/µL, donde la solución de lípido puede ser EpaDhax¹⁵⁰ o DHA, Sigma D-2534 u otro aceite rico en DHA
- la solución de emulsionante es una solución madre stock de BSA
- 55 - ambos elementos, es decir la solución de lípido / ácido graso puro y solución madre de stock de BSA, se mezclan en una proporción 1:2. agitando hasta que se forme la emulsión.
12. Procedimiento según la reivindicación 10 caracterizado porque la suspensión de biomasa de microalgas vivas se realiza mediante centrifugado u otro procedimiento de concentración como por ejemplo sedimentación, floculación, filtración tangencial.
- 60

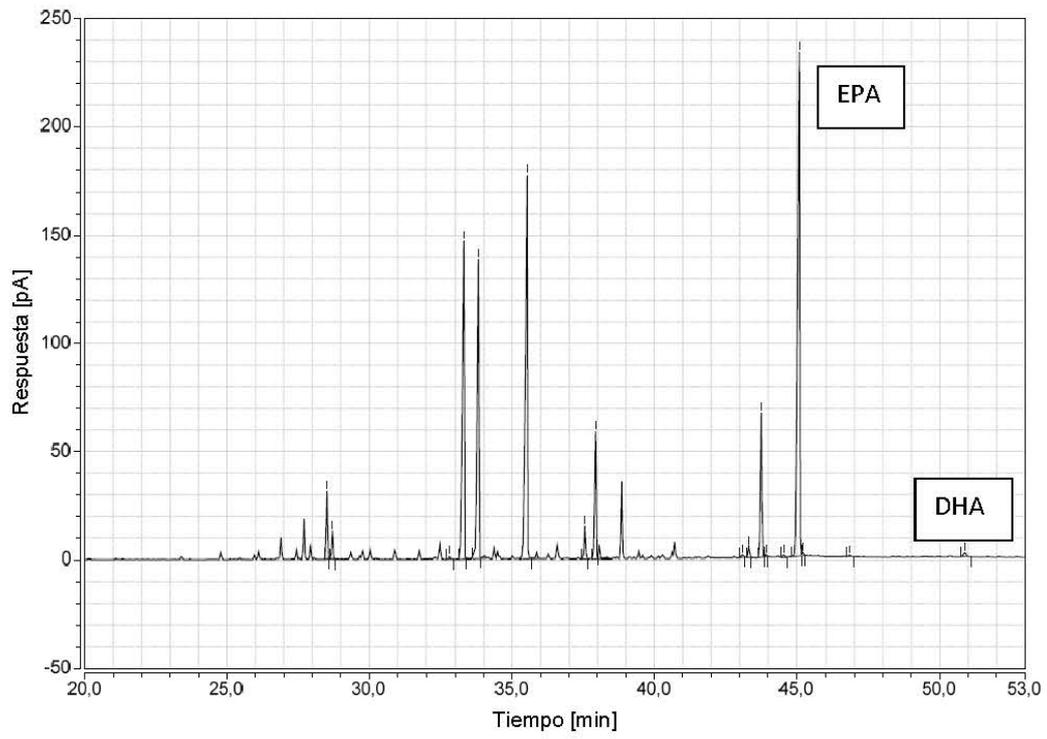


FIG. 1

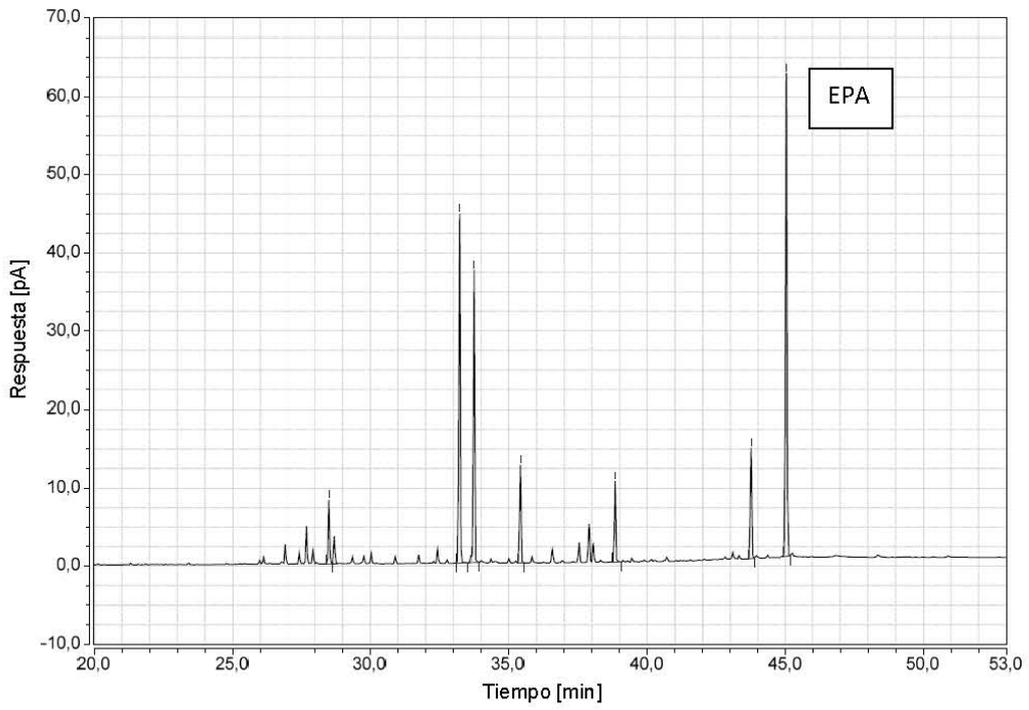


FIG. 2

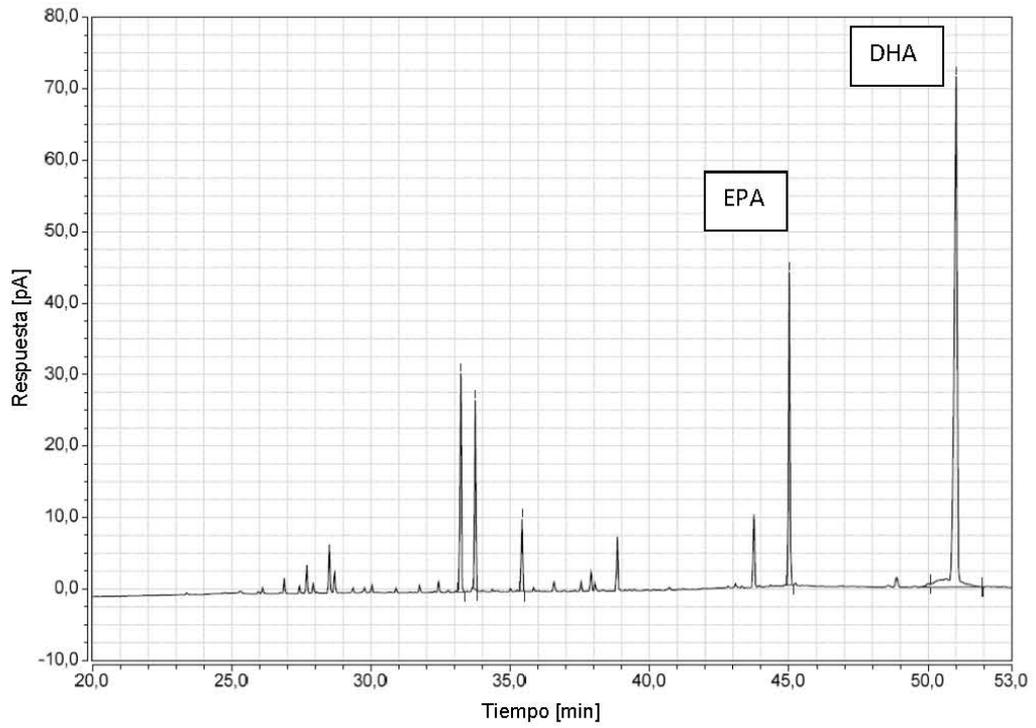


FIG. 3

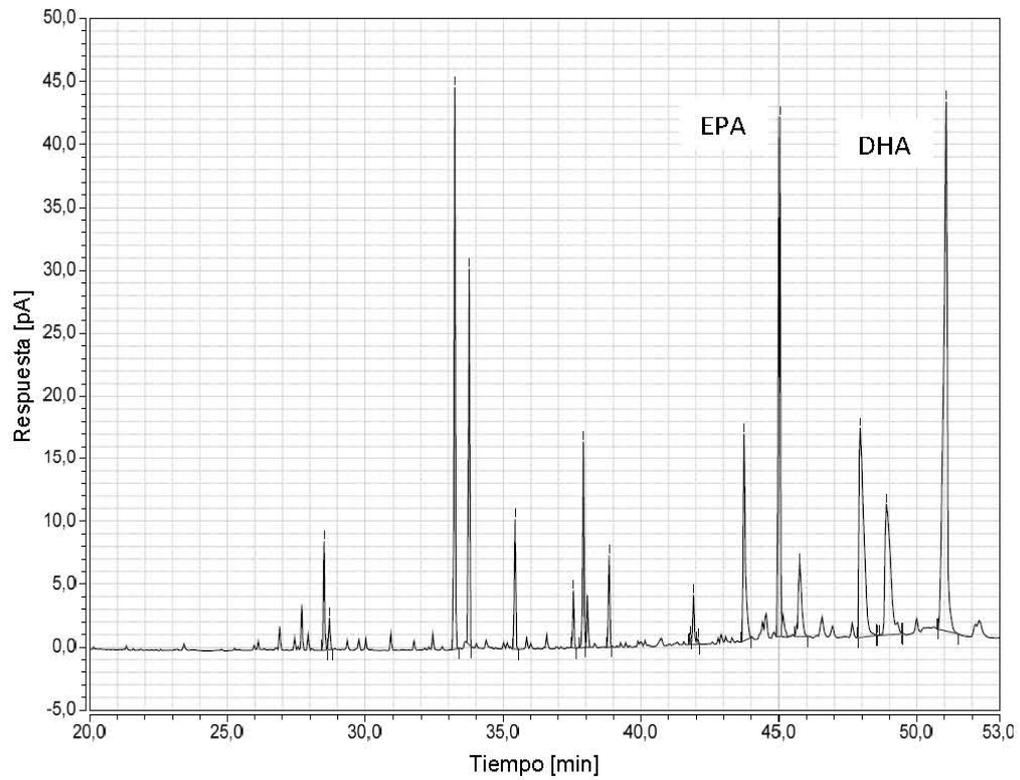


FIG. 4

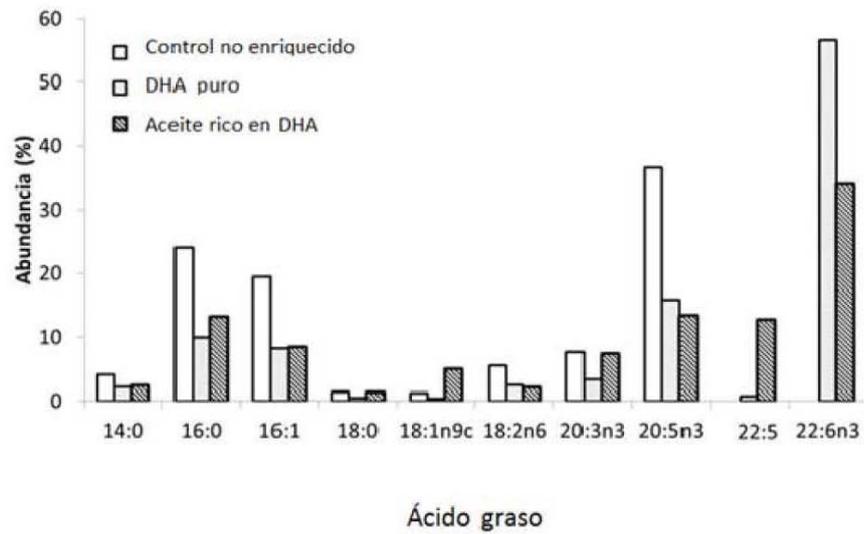


FIG. 5

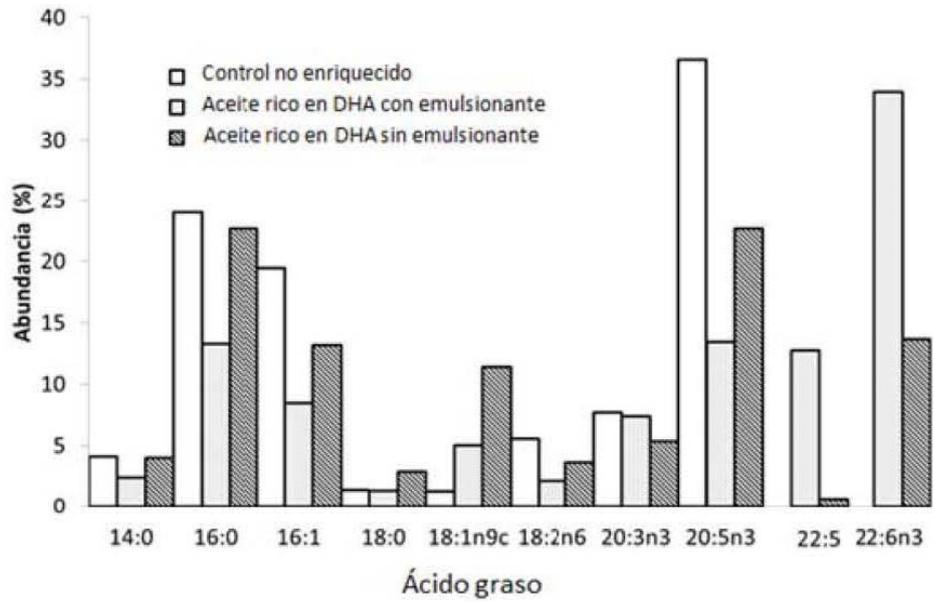


FIG. 6

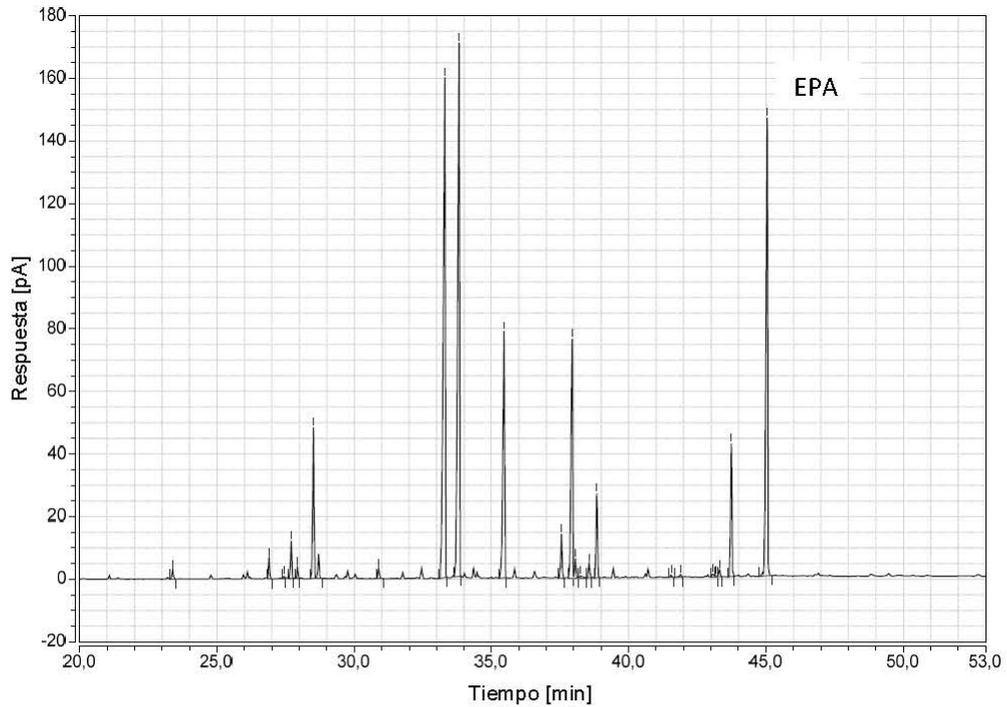


FIG. 7

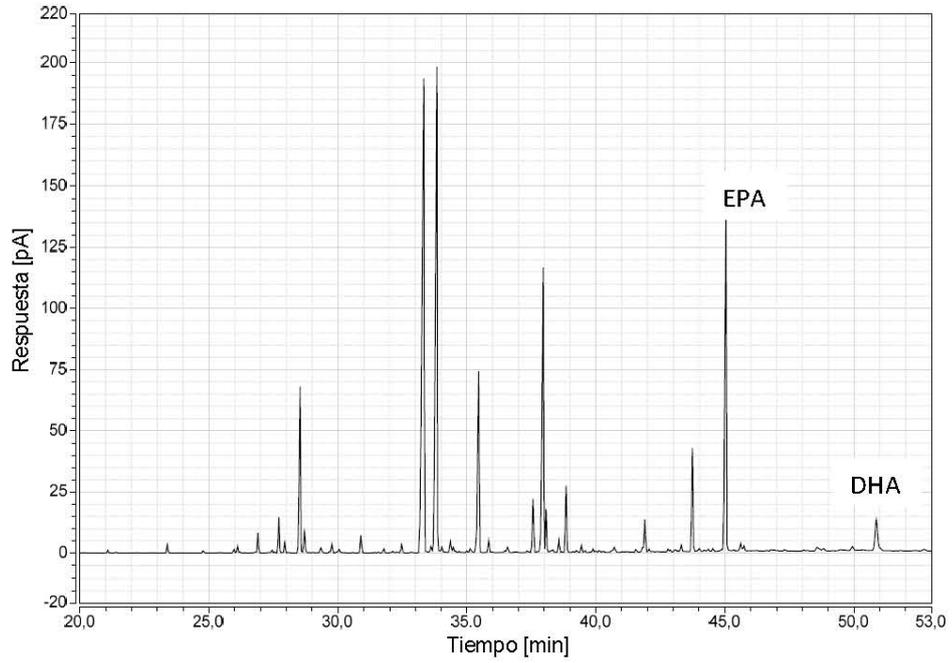


FIG. 8

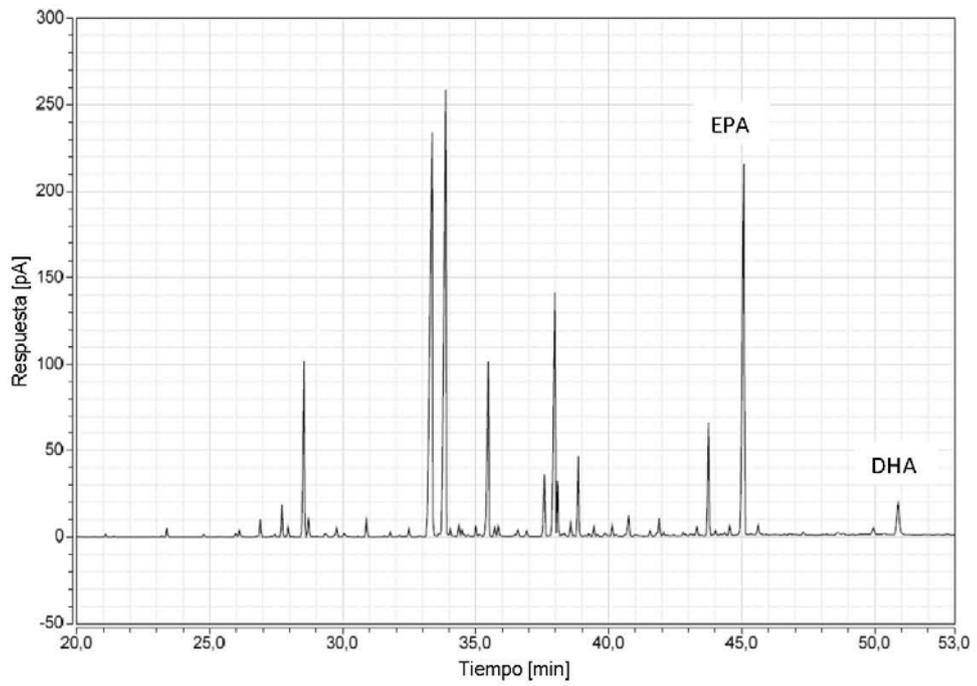


FIG. 9