

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 580**

51 Int. Cl.:

C12P 7/64 (2006.01)

C12N 1/12 (2006.01)

C12R 1/89 (2006.01)

C12R 1/90 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07818855 .4**

96 Fecha de presentación: **09.10.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2084290**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.08.2009**

54 Título: **Producción de ácidos grasos omega-3 en microflora de Thraustochytriales utilizando medio modificado**

30 Prioridad:
27.10.2006 EP 06022494
27.10.2006 US 863138 P

73 Titular/es:
LONZA AG
MÜNCHENSTEINERSTRASSE 38
4052 BASEL, CH

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.08.2012

72 Inventor/es:
KIY, Thomas;
LUY, Markus y
ZEUMER, Oliver

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.08.2012

74 Agente/Representante:
Carvajal y Urquijo, Isabel

ES 2 386 580 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

Producción de Ácidos Grasos Omega-3 en Microflora de Thraustochytriales Utilizando Medio Modificado

La presente invención se relaciona con métodos mejorados para la producción de ácidos grasos omega-3 mediante microorganismos que pertenecen a Thraustochytriales utilizando una composición modificada del medio de cultivo. En particular, la invención está dirigida a un proceso para la producción de ácidos grasos omega-3 al cultivar microflora, tal como las cepas de Ulkenia, Thraustochytrium y/o Schizochytrium, en fermentadores que incluye la etapa de cultivar la microflora Thraustochytriales en un ambiente de iones de sodio reducidos e iones de potasio aumentados.

La captación de ciertos ácidos grasos omega-3 tiene diversos efectos beneficiosos en el cuerpo humano o animal, que incluye pero no se restringe a la reducción de enfermedades cardiovasculares e inflamatorias. Se sabe que diversos miembros del orden Thraustochytriales son excelentes productores de ácidos grasos poliéicos en fermentadores, especialmente cuando se cultivan a niveles bajos de salinidad, y de esta manera se pueden utilizar para la producción comercial de ácidos grasos omega-3 altamente insaturados tales como DHA, que es uno de los ácidos grasos omega-3 más importantes.

Las microalgas marinas derivadas del mar requieren de manera general condiciones definidas para el cultivo y producción de lípidos. Por ejemplo el medio utilizado para el cultivo y/o la fermentación de estos organismos deben tener un cierto rango de salinidad con el fin de mantener el cultivo y la producción de lípidos. A partir de Bahnweg, Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerh., 17 (1979), 245-268, se sabe que las cepas tales como Thraustochytrium aureum crecen mejor en concentraciones de NaCl en un rango de 1.5 % a 3 % y que la omisión de iones de potasio del medio resulta en un crecimiento reducido de estas cepas mientras que el crecimiento de otras cepas tales como Schizochytrium aggregatum parece no estar afectado. Adicionalmente, es necesario que el medio pueda tener un cierto rango de pH. Si este requerimiento no cumple con el crecimiento de Thraustochytriales las células detienen y/o producen menos ácidos poliéicos. De acuerdo con Bahnweg, Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerh., 17 (1979), 245-268 el pH óptimo para la mayor parte de las cepas Thraustochytriales está entre pH 6.0 y pH 8.0 mientras que no se observa crecimiento por debajo de pH 5.0. Sin embargo, durante la fermentación el pH cambia con el consumo de nutrientes en el caldo de cultivo de fermentación y la liberación de productos de desperdicio de las células en el caldo de cultivo. El documento US 5,340,594 describe que el medio de cultivo se vuelve más alcalino durante la fermentación y que de esta manera el pH se ha controlado mediante la adición del ácido. En contraste el documento DE 103 52 837 A1 reporta que durante la fermentación de microorganismos marinos el medio de cultivo se acidifica si no se controla el pH.

El medio más frecuentemente utilizado para la fermentación de Thraustochytriales tiene una concentración de cloruro de sodio relativamente alta. Sin embargo, el documento US 6,410,281 B1 de Barclay se sabe que tal concentración alta de cloruro en el medio utilizado para la fermentación de Thraustochytriales promueve la corrosión en fermentadores de acero inoxidable. Otro problema encontrado en la fermentación de Thraustochytriales es que el medio de fermentación utilizado aunque tiene un nivel de salinidad relativamente alto tiene un contenido muy bajo de iones de metal importante, tal como potasio, requerido para un cultivo de alta densidad o producción alta de lípidos de Thraustochytriales.

El documento WO 2005/045003 describe un proceso para cultivar microorganismos del género Thraustochytriales, de acuerdo con los cuales los microorganismos se cultivan en un medio bajo en sal sin agregar sales de sodio y sales de cloro, el contenido de sal total es menor de 3.5 g/L (que corresponde a menos de 10 por ciento del contenido de agua de mar), después de lo cual se aíslan los PUFA de los microorganismos y/o el medio.

El documento WO 2005/035775 describe métodos para la producción de ácidos grasos altamente insaturados mediante microorganismos marinos, que incluyen dinoflagelado marino heterotrófico Chryptocodium, utilizando bajos niveles de iones de cloruro. Específicamente, se describen métodos para aumentar la producción de ácidos grasos altamente insaturados mediante microorganismos marinos mientras crecen en medio bajo en cloruro al manipular las concentraciones de iones de sodio y de iones de potasio.

El documento US 6,410,281 describe un proceso para cultivar la microflora Thraustochytrium, Schizochytrium y mezclas de los mismos, que incluye el cultivo de la microflora en medio de fermentación que contiene sales de sodio que no contienen cloruro en particular sulfato de sodio.

El documento WO 2005/045050 describe un método optimizado para la producción de PUFA al cultivar microorganismos del orden Thraustochytriales en un medio de fermentación que tiene pH estabilizado utilizando carbonato de calcio y comprende 3 a 15 g/L de CaCO₃, después de lo cual los PUFA se aíslan de los microorganismos y/o del medio.

Así, subsiste una necesidad en la técnica de un medio mejorado para la fermentación de Thraustochytriales y también de un proceso mejorado para el cultivo de estas microalgas que permiten una densidad mayor de la fermentación de las células Thraustochytriales en un fermentador y también permiten la producción de cantidades mayores de ácidos grasos altamente insaturados tales como DHA de los mismos mientras se reducen los efectos colaterales negativos asociados con los procesos de fermentación utilizando un medio de alta salinidad tal como la corrosión del fermentador.

La presente invención proporciona procesos para la fermentación de microorganismos que pertenecen a Thraustochytriales caracterizado porque durante la fermentación el pH del medio se controla mediante la adición de una base, en particular hidróxido de potasio. Adicionalmente, la presente invención proporciona procesos para obtener lípidos a partir de microorganismos de Thraustochytriales caracterizado porque durante la fermentación de estas microalgas el pH del medio de fermentación se controla mediante la adición de una base, preferiblemente hidróxido de potasio.

Así, de acuerdo con la presente invención, se utiliza hidróxido de potasio como agente que controla el pH durante la fermentación de las cepas Thraustochytriales. La adición de hidróxido de potasio al medio de fermentación evita que el pH del medio se cambie debido al consumo de ciertos nutrientes y la formación de productos de desperdicio mediante las células microbianas como los iones OH del hidróxido de potasio proporcionan la neutralización de protones liberados en el medio. También, mediante la adición de hidróxido de potasio la concentración de iones de potasio en el medio se aumenta notablemente que tiene un efecto positivo y ventajoso en el cultivo y la producción de lípidos de las células microbianas cultivadas.

Adicionalmente, el uso de hidróxido de potasio como agente que controla el pH en los métodos de la invención contribuye ventajosamente a una corrosión considerablemente reducida del equipo utilizado para fermentación, en particular una corrosión reducida del fermentador de acero inoxidable. En la técnica anterior se utilizan frecuentemente ácidos como agente que controla el pH. Ver por ejemplo documento US 5,340,594. Uno de los ácidos más frecuentemente utilizados en la técnica como agente que controla el pH es HCl. Luego de disolución este ácido disocia en el ión de cloruro cargado negativamente y el ión de hidrógeno cargado positivamente. Sin embargo, los aniones tales como los iones de cloruro contribuyen notablemente a la corrosión del fermentador de acero inoxidable. Ver por ejemplo documento US 6,410,281. Por lo tanto, en la patente se sugiere utilizar sales de sodio sin cloruro en el medio de fermentación con el fin de reducir la corrosión de los fermentadores de acero inoxidable, por ejemplo carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, sulfato de sodio y similares. Sin embargo, la patente no presta atención al hecho de que una cantidad considerable de iones que contribuye a la corrosión del fermentador se introduce mediante la adición del agente que controla el pH en el medio de fermentación. En contraste a esa patente, la presente invención evita completamente la introducción de aniones perjudiciales mediante el agente que controla el pH que contribuye a la corrosión del fermentador. En su lugar el hidróxido de potasio (KOH) utilizado como agente que controla el pH disocia en iones de potasio e hidróxido por lo que los últimos iones luego de disociación se neutralizarán inmediatamente por los iones de hidrógeno presentes en el medio de fermentación. Así, en comparación con el documento US 6,410, 281 la presente invención resuelve el problema de la corrosión de los fermentadores en una forma sustancialmente diferente.

Así, un aspecto de la presente invención se relaciona con un proceso para la fermentación de microorganismos del orden Thraustochytriales que comprende la etapa de cultivar los microorganismos bajo condiciones controladas en un medio de fermentación que comprende una concentración de sodio en el rango de 0.2 g/litro a aproximadamente 10.8 g/litro, ajustar el valor de pH del medio durante la fermentación con hidróxido de potasio y cosechar la biomasa de microalgas.

Otro aspecto de la presente invención se relaciona con un método para reducir la corrosión de un fermentador durante la fermentación de microorganismos Thraustochytriales en un medio de fermentación de solución salina que comprende cultivar los microorganismos en un fermentador bajo condiciones controladas en un medio de fermentación de solución salina que comprende una concentración de sodio en el rango de 0.2 g/litro a aproximadamente 10.8 g/litro y ajustar el valor de pH del medio durante la fermentación con una base, en particular hidróxido de potasio. El proceso de la invención para reducir la corrosión también incluye las etapas de cosechar la biomasa microbiana después de fermentación y opcionalmente la etapa de extraer lípidos de la biomasa.

El proceso de la invención para la fermentación de microorganismos y también el proceso de la invención para reducir la corrosión de un fermentador comprende las etapas de cultivar y/o fermentar microalgas de Thraustochytriales tales como Ulkenia, Thraustochytrium, Schizochytrium, Althornia, Aplannochytrium, Japanochytrium o Labyrinthuloides en un medio de cultivo bajo condiciones definidas.

El medio líquido utilizado para los procesos de acuerdo con la invención comprende una fuente de carbono adecuado tal como un azúcar. Los ejemplos preferidos de una fuente de carbono incluyen, sin estar restringido a, glucosa, almidón, y molasas. El medio de fermentación o caldo de cultivo de fermentación utilizado para el proceso de la invención también comprende una fuente de nitrógeno adecuada tal como una sal de nitrato, compuesto de amonio, aminoácidos, extracto de levadura, licor de maceración de maíz etc. El medio utilizado para el proceso de la

invención comprende adicionalmente iones de cloruro en una concentración de aproximadamente 0.2 g/litro a aproximadamente 10.8 g/litro que corresponde aproximadamente a la concentración de iones de sodio de agua de mar. Adicionalmente, el medio utilizado para los procesos de cultivo y/o fermentación también contiene iones de potasio. En realizaciones preferidas de la invención el medio contiene iones de potasio en un rango de concentración de 0.1 g/litro a 1.0 g/litro.

El cultivo de las microalgas y la producción de lípidos mediante el proceso de la invención se puede afectar en cualquier temperatura que permite un cultivo satisfactorio y/o una alta producción de lípidos de las células, por ejemplo en una temperatura entre 15 °C y 48 °C, preferiblemente de 25 °C a 28 °C. El cultivo de las microalgas se puede llevar a cabo en recipientes y tanques adecuados para la fermentación o el cultivo de microalgas. Los dispositivos de fermentación preferidos incluyen, sin estar restringidos a, recipientes de agitación y/o de aireación, reactores de elevación con aire, matraces de agitación y similares. Cuando el cultivo de la microflora Thraustochytriales se lleva a cabo en un recipiente grande o reactor, se prefiere producir un inóculo al inocular un medio de caldo de cultivo de nutrientes con una alícuota de un cultivo inclinado de una o más cepas de microalgas o una alícuota de un cultivo criopreservado de una o más cepas. Este inóculo luego se transfiere en el medio líquido de volúmenes sucesivamente grandes hasta que ha alcanzado finalmente un volumen adecuado para inoculación en el volumen de producción final.

En una realización preferida del proceso de la invención los microorganismos Thraustochytriales que se van a fermentar pertenecen al género Thraustochytrium, Schizochytrium, Ulkenia, Althornia, Aplananochytrium, Japanochytrium o Labyrinthuloides. Ejemplos preferidos particulares de especies o cepas incluyen, sin estar restringido a, Ulkenia SAM 2179, Thraustochytrium aureum, Schizochytrium limacinum SR21 y Schizochytrium aggregatum. Las microalgas del orden Thraustochytriales pertenecen al grupo de organismos heterotróficos, es decir son organismos que obtienen la energía y el carbono celular de sustratos orgánicos y son capaces de crecer en la oscuridad, es decir en la ausencia de luz.

De acuerdo con la invención también se pueden fermentar las mezclas de diferentes especies. Esto significa que dos o más especies Thraustochytriales diferentes se pueden fermentar simultáneamente en el mismo fermentador con el fin de producir una biomasa mezclada que comprende células de por lo menos dos especies diferentes de Thraustochytriales y/o un aceite mezclado que comprende lípidos producidos por dos o más especies diferentes.

Al cultivar dos o más especies diferentes simultáneamente en el mismo fermentador es posible obtener una biomasa con un perfil de lípido que difiere considerablemente solo del perfil de lípido de una de estas especies. En una realización preferida de la invención se fermentan Ulkenia SAM2179 y Schizochytrium limacinum SR21 con el fin de producir una biomasa mezclada y también un aceite mezclado.

Usualmente la fermentación ocurre a una temperatura de más de 15 °C, preferiblemente a una temperatura de más de 20 °C, más preferido a una temperatura de más de 25 °C tal como aproximadamente 28 °C. De acuerdo con la presente invención las microalgas se fermentan o se cultivan durante un periodo de aproximadamente 2 a aproximadamente 14 días, preferiblemente hasta que se agotan las fuentes de nutrientes en el medio de fermentación.

De acuerdo con el proceso de la invención mediante la adición de hidróxido de potasio el valor de pH del medio de fermentación se mantiene en un rango de 3.5 a 8.0, preferiblemente en un rango de aproximadamente 4.0 a aproximadamente 7.0. Se puede agregar hidróxido de potasio al medio de cultivo ya sea en forma sólida tal como en forma de glóbulos de hidróxido de potasio o en la forma de una solución acuosa.

De acuerdo con la invención, se agrega hidróxido de potasio en tal cantidad al medio que la concentración final de iones de potasio es por lo menos aproximadamente 0.2 g/litro, por lo menos aproximadamente 0.3 g/litro, por lo menos aproximadamente 0.4 g/litro, por lo menos aproximadamente 0.5 g/litro, por lo menos aproximadamente 0.6 g/litro, o por lo menos aproximadamente 0.7 g/litro.

Se prefiere que el rango superior de la concentración de iones de potasio es más de aproximadamente 10 g/litro, más de aproximadamente 6 g/litro, más de aproximadamente 4 g/litro, más de aproximadamente 3 g/litro, más de aproximadamente 2.5 g/litro, más de aproximadamente 2 g/litro, más de aproximadamente 1.5 g/litro, o más de aproximadamente 1 g/litro.

Las concentraciones más preferidas de los iones de potasio son aproximadamente 1.5 g/litro a aproximadamente 3.0 g/litro, en particular 2.0 g/litro a 2.4 g/litro.

Durante fermentación, es decir el cultivo y la propagación de las células Thraustochytriales acumulan los lípidos, en particular ácidos grasos omega-3 altamente insaturados. Estas células que contienen lípidos se pueden cosechar en la fase exponencial de cultivo o después, cuando las células han alcanzado su densidad celular máxima con el fin de obtener una biomasa rica en ácidos grasos insaturados omega-3. Si se desea obtener una biomasa con un

contenido significativamente aumentado de ácidos grasos insaturados omega- 3, el cultivo de los thraustochytrids se puede manipular para llegar a estar limitado en nutrientes. En una realización preferida del proceso de la invención el cultivo se manipula de tal manera que el nitrógeno se limita durante un tiempo adecuado, por ejemplo al transferir el cultivo a un medio libre de nitrógeno.

5 Mediante los procesos de la invención se puede obtener una densidad de biomasa del medio de fermentación de más de 50 g/litro, preferiblemente de más de 70 g/litro, más preferido de más de 90 g/litro y más preferido de más de 100 g/ litro. La biomasa seca tiene un contenido de lípidos de ácido graso de por lo menos 20 % en peso, preferiblemente de por lo menos 30 % en peso, más preferiblemente de por lo menos 40 % en peso y más preferiblemente de por lo menos 50 % en peso. De manera general, por lo menos aproximadamente 20 % de los
10 ácidos grasos o lípidos producidos por las microalgas Thraustochytriales en los procesos de la invención y contenidos en la biomasa son ácidos grasos poliinsaturados, en particular ácidos grasos omega-3 tales como DHA. Preferiblemente, más de 30 % de los lípidos contenidos en la biomasa son ácidos grasos poliinsaturados, en particular ácidos grasos omega-3 tales como DHA. Se prefiere que más de 40 % o más de 50 % de los ácidos grasos contenidos en la biomasa sean ácidos grasos poliinsaturados, en particular DHA.

15 Se puede hacer la cosecha de las células por ejemplo mediante técnicas de filtración, centrifugación con o sin complejación previa o floculación mediante métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo las células se pueden cosechar con filtro de correa, filtro de tambor rotativo y similares. Después de cosechar las células se pueden lavar, congelar, liofilizar o secar por rociado y almacenar bajo condiciones no oxidantes. Después de cosechar la biomasa obtenida rica en ácidos grasos insaturados omega-3, en particular rica en DHA, también se puede someter a un
20 proceso de secado con el fin de obtener una biomasa seca. Antes de secado la célula cosechada se puede lavar opcionalmente. Adicionalmente, una biomasa obtenida después de fermentar una especie particular de Thraustochytriales, se puede mezclar con una biomasa obtenida después de fermentar una segunda especie de Thraustochytriales con el fin de obtener una mezcla de biomasa. En una realización preferida se mezcla una biomasa Ulkenia SAM2179 con una biomasa de Schizochytrium limacinum. La biomasa obtenida se puede agregar
25 directamente a productos de alimento para animal o productos alimenticios destinados para el consumo humano.

La presente solicitud también se relaciona con una biomasa o una mezcla de biomasa obtenida mediante los procesos de la invención y adicionalmente el uso de los mismos para la producción de composiciones de alimento y alimenticias.

30 Otro aspecto de la presente invención se relaciona con un proceso para obtener lípidos, en particular ácidos grasos insaturados omega-3 tales como DHA, a partir de microorganismos que pertenecen a Thraustochytriales que comprende la etapa de cultivar los microorganismos bajo condiciones controladas en un medio de fermentación que comprende una concentración de sodio en el rango de 0.2 g/litro a aproximadamente 10.8 g/ litro, ajustar el valor de pH del medio durante la fermentación con hidróxido de potasio, cosechar la biomasa de microalgas y extraer los lípidos de esta.

35 En esta realización de la presente invención las etapas de cultivar los microorganismos bajo condiciones controladas en un medio de fermentación que comprende una concentración de sodio en el rango de 0.2 g/litro a aproximadamente 10.8 g/litro, ajustar el valor de pH del medio durante la fermentación con hidróxido de potasio y cosechar la biomasa de microalgas se puede hacer como se destacó anteriormente. Después de cosechar las células así obtenidas se puede someter la biomasa seca o húmeda a uno cualquiera de los métodos de extracción
40 conocidos en la técnica que son adecuados para extraer los lípidos de las células de microalgas. Los métodos de extracción incluyen, sin estar restringidos a, extracción supercrítica de CO₂, extracción de HPLC, extracción mediante el uso de solventes o mezclas de solventes tales como hexano, cloroformo, éter y metanol. Antes que se apliquen dichos métodos de extracción a las paredes celulares de las células de la biomasa cosechada se pueden interrumpir mediante técnicas tales como sonicación, molido, congelamiento-descongelamiento o interrupción
45 enzimática. El aceite crudo o los lípidos crudos que se pueden obtener al aplicar dicho método de extracción se pueden purificar adicionalmente mediante métodos bien conocidos en la técnica, que incluyen, pero no se restringen a, refinamiento, cristalización en frío, etc. De acuerdo con la invención es posible mezclar un aceite que se puede obtener después de la fermentación de una especie dada de Thraustochytriales con un segundo aceite que se puede obtener después de la fermentación de una segunda especie de Thraustochytriales.

50 Más de 20 % de los lípidos así obtenidos son ácidos grasos poliinsaturados, en particular ácidos grasos omega-3 tales como DHA. Preferiblemente, más de 30 % de los lípidos así obtenidos son ácidos grasos poliinsaturados, en particular ácidos grasos omega-3 tales como DHA. Se prefiere más que más de 40 % o más de 50 % de los ácidos grasos así obtenidos sean ácidos grasos poliinsaturados, en particular DHA. Los lípidos así obtenidos se pueden utilizar para la producción de composiciones de alimento, composiciones alimenticias, composiciones farmacéuticas
55 y composiciones cosméticas.

Todavía otro aspecto de la presente invención se relaciona con un proceso para obtener lípidos, en particular ácidos grasos insaturados omega- 3 tales como DHA, a partir de microorganismos que pertenecen a Thraustochytriales, dicho proceso comprende la etapa de cultivar los microorganismos bajo condiciones controladas en un medio de

fermentación que comprende una concentración de sodio en el rango de 0.2 g/litro a aproximadamente 10.8 g/litro, ajustar el valor de pH del medio durante la fermentación con hidróxido de potasio, y extraer los lípidos de esta.

Ejemplo 1

Se prepara un cultivo de inóculo de acuerdo con el siguiente protocolo.

5 Se inocula un matraz de agitación de 2000 ml que contiene 350 ml de un medio de precultivo estéril que consiste de sal Tropic Marin 16.7 g, glucosa 30 g, extracto de levadura 10 g por 1000 ml de agua destilada, pH 6.0 con 1 ml de cultivo criopreservado de *Ulkenia* SAM 2179. El matraz de agitación se incuba durante 68 horas a una temperatura de 25 °C y a 160 rpm en un agitador rotatorio. Después de 68 horas la densidad óptica a 660 nm es 16.1.

10 Luego 135 ml (3 %) del cultivo de inóculo *Ulkenia* SAM 2179 así preparado se transfieren a un fermentador que contiene un medio de fermentación de la siguiente composición: por 1000 ml de agua potable, dextrosa 165 g, fosfato de potasio 3 g, sulfato de amonio 5 g, cloruro de magnesio 1 g, sulfato de sodio 1 g, cloruro de calcio 0.3 g, licor de maceración de maíz 3.75 g, pH 4. El fermentador tiene un volumen total de 5 litros y un volumen de trabajo de 4.5 litros.

15 La fermentación se conduce a 28 °C y 380 rpm durante aproximadamente 166 horas. El índice de aireación es 3.5 litros/min. Para controlar el pH durante la fermentación se prepara una solución de KOH al 20 % esterilizada. El pH se controla automáticamente de tal manera que no alcanza un valor por debajo de 4.

Después de aproximadamente 155 horas se agotan los nutrientes principales en el medio de fermentación. En este momento se toman muestras del medio que contiene células microbianas y se analizan la cantidad de biomasa y el contenido de lípidos.

20 Las muestras así tomadas del caldo de cultivo rico en biomasa se lavan y luego se secan por congelamiento. Luego que las muestras de biomasa se someten a una transesterificación con ácido clorhídrico metanólico. El perfil de ácido graso y el contenido de ácido graso de las muestras se determinan mediante cromatografía de gas de acuerdo con protocolos estándar bien conocidos.

25 Se obtienen los siguientes resultados: El peso seco de la biomasa es 68.7 g/litro. El contenido de DHA de esta biomasa es 16.1 g/litro. El contenido de DHA de ácidos grasos totales es 45 %. La relación entre DHA y DPA, un ácido graso insaturado omega-6, es 3.5.

Ejemplo 2

Se prepara un cultivo de inóculo de acuerdo con el siguiente protocolo.

30 Se inocula un matraz de agitación de 2000 ml que contiene 350 ml de un medio de precultivo estéril que consiste de sal Tropic Marin 16.7 g, glucosa 30 g, extracto de levadura 10 g por 1000 ml de agua destilada, pH 6.0 con 1 ml de cultivo criopreservado de *Ulkenia* SAM 2179. El matraz de agitación se incuba durante 48 horas a una temperatura de 25 °C y a 160 rpm en un agitador rotatorio. Después de 48 horas la densidad óptica a 660 nm es 9.5.

Luego se transfieren 300 ml (3%) del cultivo de inóculo *Ulkenia* SAM 2179 así preparado a un fermentador que contiene un medio de fermentación de la siguiente composición:

35 Dextrosa 165 g/litro

Licor de maceración de maíz 3.75 g/litro

KH₂PO₄ 3.0 g/litro

NaCl 0.8 g/litro

MgSO₄ X 7 H₂O 1.5 g/litro

40 CaCl₂ X 2 H₂O 0.3 g/litro

(NH₄)₂SO₄ 5.0 g/litro

pH 4.0

ES 2 386 580 T3

El fermentador tiene un volumen de trabajo total de 10 litros.

La fermentación se conduce a 28 °C y 350 rpm durante aproximadamente 114 horas. El índice de aireación es 7.5 litros/min. Para controlar el pH durante la fermentación se prepara una solución de KOH al 20 % esterilizada. El pH se controla automáticamente de tal manera que no alcanza un valor por debajo de 4.

- 5 Después de aproximadamente 110 horas se agotan los nutrientes principales en el medio de fermentación. En este momento las muestras del medio que contiene células microbianas se toman y se analizan la cantidad de biomasa y el contenido de lípidos.

- 10 Las muestras así tomadas del caldo de cultivo rico en biomasa se lavan y luego se secan por congelamiento. Luego que las muestras de biomasa se someten a una transesterificación con ácido clorhídrico metanólico. El perfil de ácido graso y el contenido de ácido graso de las muestras se determinan mediante cromatografía de gas de acuerdo con protocolos estándar bien conocidos.

Se obtienen los siguientes resultados: El peso seco de la biomasa es 62.3 g/litro. El contenido de DHA de esta biomasa es 15.8 g/litro. El contenido de DHA de ácidos grasos totales es 44.3 %. La relación entre DHA y DPA, un ácido graso insaturado omega-6, es 3.5.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Proceso para la fermentación de microorganismos que pertenecen a Thraustochytriales, caracterizado porque durante la fermentación de los microorganismos el valor de pH del medio de fermentación se controla mediante la adición de hidróxido de potasio, dicho proceso comprende adicionalmente la etapa de cultivar los microorganismos en un medio de fermentación que comprende una concentración de sodio en el rango de 0.2 g/litro a aproximadamente 10.8 g/litro, ajustar el valor de pH del medio durante la fermentación con hidróxido de potasio y cosechar la biomasa de microalgas.
- 10 2. Proceso para obtener lípidos a partir de microorganismos que pertenecen a Thraustochytriales, caracterizado porque durante la fermentación de los microorganismos el valor de pH del medio de fermentación se controla mediante la adición de hidróxido de potasio, dicho proceso comprende adicionalmente la etapa de cultivar los microorganismos en un medio de fermentación que comprende una concentración de sodio en el rango de 0.2 g/litro a aproximadamente 10.8 g/litro, ajustar el valor de pH del medio durante la fermentación con hidróxido de potasio, cosechar la biomasa de microalgas y extraer los lípidos de esta.
- 15 3. Método para reducir la corrosión de un fermentador durante la fermentación de microorganismos Thraustochytriales, dicho método comprende cultivar los microorganismos en un fermentador en un medio de fermentación de solución salina que comprende una concentración de sodio en el rango de 0.2 g/litro a aproximadamente 10.8 g/litro y ajustar el valor de pH del medio durante fermentación mediante la adición de hidróxido de potasio.