

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 454 196**

51 Int. Cl.:

C12P 7/64

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.2004 E 04785345 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2014 EP 1702073**

54 Título: **Producción de niveles altos de DHA en microalgas utilizando cantidades modificadas de cloruro y potasio**

30 Prioridad:

02.10.2003 US 508505 P

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

09.04.2014

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)
Het Overloon 1
6411 TE Heerlen, NL**

72 Inventor/es:

**BEHRENS, PAUL W.;
THOMPSON, JOHN M.;
APT, KIRK;
PFEIFER, JOSEPH W., III;
WYNN, JAMES P.;
LIPPMEIER, JAMES CASEY;
FICHTALI, JAOUAD y
HANSEN, JON**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 454 196 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 niveles altos de DHA en microalgas utilizando cantidades modificadas de cloruro y potasio

Campo de la Invención

5 Esta invención se refiere en general a métodos para producción de ácidos grasos fuertemente insaturados por microorganismos marinos utilizando cantidades modificadas de iones cloruro y potasio en el medio de cultivo. Más específicamente, la invención está dirigida a un proceso para producción de niveles altos de ácido docosahexaenoico (DHA) por cultivo de microalgas marinas que incluyen el dinoflagelado marino heterótrofo, *Crypthecodinium*, en fermentadores en condiciones no corrosivas, que incluye cultivo en un ambiente pobre en ion cloruro y rico en ion potasio. Se describen adicionalmente métodos para producción de ácidos grasos fuertemente
10 insaturados, que incluyen DHA, por microorganismos marinos a niveles de pH bajos.

Antecedentes de la Invención

Los efectos beneficiosos de la ingestión dietética incrementada de ácidos grasos omega-3 de cadena larga en humanos han sido bien documentados, lo que incluye la reducción de enfermedades cardiovasculares e inflamatorias (a saber, artritis y aterosclerosis), reducción de la depresión, aumento de la duración de gestación en
15 el tercer trimestre, e inhibición del crecimiento de tumores. Se ha encontrado que varios microorganismos marinos heterótrofos producen niveles altos de estos ácidos grasos esenciales importantes, incluyendo el del género *Crypthecodinium* (Jiang y Chen, Process Biochemistry 35 (2000) 1205-1209; Jiang y Chen, Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, (1999) Vol. 23, 508-513; Vazhappilly y Chen, Journal of the American Oil Chemists Society, (1998) Vol. 75, No. 3 p 393-397; Kyle, Patente U.S. No. 5,407,957; Patente U.S. No. 5,397,591; Patente U.S. No. 5,492,938; y Patente U.S. No. 5,711,983).
20

Crypthecodinium cohnii es uno de los organismos más deseables a utilizar para la producción de DHA (C22:6n-3), uno de los ácidos grasos omega-3 de cadena larga más importantes. *C. cohnii* es ventajoso debido a que DHA es el único ácido graso poliinsaturado (PUFA) producido por este organismo en cantidades apreciables. Otros organismos producen dos o más ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) en sus lípidos, y la complejidad de su perfil lipídico
25 puede limitar el uso de sus aceites en algunas aplicaciones alimentarias y farmacéuticas (v.g. debido a la presencia de otros PUFAs indeseables en el aceite o debido a ratios de los diferentes PUFAs que caen fuera del intervalo deseable para la aplicación específica). En el ambiente marino, *Crypthecodinium cohnii* se encuentra usualmente en agua de mar de salinidad alta, y como tal, está adaptado para crecimiento en un ambiente con una elevada concentración de cloruro. De hecho, la mayoría de los cultivos en la investigación publicada acerca de *C. cohnii*
30 demuestran que el crecimiento y la producción de DHA se comporta óptimamente a salinidades mayores que aproximadamente 20‰ del agua de mar (Jiang y Chen). La concentración de ion cloruro equivalente a 20‰ en agua de mar es aproximadamente 3870 ppm de ion cloruro o 3,87 g/l de ion cloruro (Horne 1969).

Tuttle y Loeblich (1975) desarrollaron un medio de crecimiento óptimo para *C. cohnii*. El medio descrito contenía una concentración de cloruro de sodio 342 milimolar (mM). Los gramos por litro equivalentes de ion sodio e ion cloruro
35 en una solución 342 mM de cloruro de sodio son 7,86 g/l de ion sodio y 12,12 g/l de ion cloruro.

Beasch & Holz (1973) informaron que cuando se cultivaba *C. cohnii* en un intervalo de concentraciones de NaCl (0,3%, 1,8% y 5,0% (1,82 g/l, 10,9 g/l y 30,3 g/l de ion cloruro, respectivamente)) la producción de lípidos (expresada como mg por 10⁹ células) disminuía a medida que descendían las concentraciones de NaCl. La producción de lípidos a 0,3% NaCl era aproximadamente un tercio de la correspondiente a 5,0% NaCl. Más recientemente, Jiang y
40 Chen (1999) determinaron los efectos de la salinidad sobre el crecimiento de las células y el contenido de DHA con 3 cepas de *Crypthecodinium cohnii* y encontraron en todos los casos que las tasas de crecimiento óptimas para las células y las producciones de DHA estaban comprendidas entre 5 g/l y 9 g/l de cloruro de sodio, lo que corresponde a 3,0 y 5,5 g/l de ion cloruro, respectivamente.

La concentración natural de cloruro en el agua del mar (19353 ppm, 0 19,35 g/l de ion cloruro (Horne 1969, página 151) promueve corrosión en los fermentadores de acero inoxidable. Por ejemplo, de los dos grados comunes de acero inoxidable utilizados en la fabricación de fermentadores, el acero inoxidable 304 es susceptible de corrosión cuando el nivel de cloruro excede de 300 ppm (0,3% g/l de ion cloruro), y el acero inoxidable 316 es susceptible de corrosión cuando el nivel de cloruro excede de 1000 ppm (1 g/l de ion cloruro). Existen otros grados de acero inoxidable que son más resistentes a la corrosión por el cloruro, pero los mismos son extremadamente caros y por
50 regla general se utilizan únicamente en equipos de fermentación empleados para la producción de compuestos muy costosos.

Aunque puede predecirse que la minimización de la corrosión de los fermentadores de acero inoxidable pueden conseguirse reduciendo las concentraciones de cloruro en el medio de cultivo, en la práctica esto no es una tarea fácil. Las microalgas marinas, que se derivan del mar, requieren generalmente cierta cantidad de ion cloruro, preferiblemente como cloruro de sodio, para mantener el crecimiento y la producción de lípidos cuando crecen en cultivo.
55

Sin embargo, los intentos realizados hasta la fecha para cultivar microalgas marinas a concentraciones bajas de cloruro al tiempo que se mantienen los niveles de producción de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 tales como DHA han sido infructuosos. Jiang y Chen (1999) fueron incapaces de demostrar producciones significativas de DHA a niveles de NaCl inferiores a 5 g/l, correspondientes a un nivel de cloruro de aproximadamente 3033 ppm o 3 g/l.

- 5 La Patente U.S. No. 6.410.281, expedida el 25 de junio de 2002, otorgada a Barclay, proporciona un método para cultivar organismos eurihalinos tales como *Thraustochytrium sp.* y *Schizochytrium sp.* en medios pobres en cloruro por sustitución de sales de sodio distintas de cloruro a fin de reemplazar el sodio perdido cuando se reducen los niveles de cloruro de sodio.

- 10 Existe necesidad de un proceso que pueda permitir la producción de un alto producción de DHA a partir de *Crypthecodinium cohnii*, al tiempo que inhiba o evite la corrosión en los recipientes de producción más deseables comercialmente, fermentadores de cultivo de acero inoxidable. Este proceso debería hacer posible un crecimiento eficaz del microorganismo en un medio que contenga preferiblemente menos de 300 ppm de cloruro. Trescientas ppm de cloruro representan un nivel de 10 a 18 veces más bajo que los niveles mínimos de cloruro que, según demostraron Jiang y Chen (1999), son los óptimos para la producción de cepas de *Crypthecodinium*.

- 15 Otra característica deseable de las fermentaciones microbianas es la capacidad para cultivar células a pH bajo (menor que o igual a aproximadamente pH = 5,0) a fin de inhibir el crecimiento de bacterias en las fermentaciones fúngicas. Sin embargo, la literatura indica que *Crypthecodinium cohnii* se desarrolla óptimamente a un pH neutro (aproximadamente pH 7). Tuttle y Loeblich en *Phycologia* vol. 14(1) 1-8 (1975) exponen que el pH óptimo para crecimiento de *Crypthecodinium* es 6,6, siendo el crecimiento "muy lento" por debajo de pH 5,5. Existe necesidad de
20 cepas y/o métodos de cultivo de *Crypthecodinium* a pH bajo al tiempo que retengan el crecimiento y la producción normales de DHA.

Sumario de la Invención

- Al intentar minimizar los niveles de cloruro de sodio en un medio de cultivo para *Crypthecodinium*, en el que el cloruro de sodio conduce al problema de corrosión de los fermentadores, los autores de la invención han descubierta
25 sorprendentemente que los niveles de cloruro de sodio pueden reducirse por manipulación de las sales de sodio y preferiblemente de potasio en el medio de cultivo para compensar la disminución de ion cloruro (hasta 300 ppm o 0,3 g/l de ion cloruro) al tiempo que se mantiene la producción de DHA similar al que se alcanza a aproximadamente 4,5 g/l de NaCl (correspondiente a 2,73 g/l de ion cloruro).

- Los autores de la presente invención han identificado condiciones de cultivo que hacen posible que *Crypthecodinium*
30 crezca en un medio con niveles de cloruro sustancialmente reducidos (hasta aproximadamente 0,3 g/l de ion cloruro) sin afectar desfavorablemente al contenido de grasa o contenido de DHA en peso seco cuando se compara con el cultivo en un medio normal "rico en cloruro". El alcance de un rendimiento comparable de DHA no era sólo una cuestión de reemplazamiento del cloruro de sodio en el medio con otras sales de sodio. De hecho, el reemplazamiento de cloruro de sodio con una cantidad equivalente de sodio procedente de otras sales de sodio (a
35 saber, sulfato de sodio) no daba como resultado una producción de DHA comparable al caso de control rico en cloruro, sino que conducía realmente a una disminución adicional en la producción de DHA del cultivo. En lugar de ello, los autores de la presente invención encontraron sorprendentemente que el rendimiento óptimo de DHA se obtenía cuando la concentración de potasio (con relación a la existente en el agua de mar a 4,5 g/l de NaCl o 17% en agua de mar) se incrementaba significativamente. Resulta inesperado que una disminución sustancial en la
40 cantidad de sodio y un aumento en la concentración de potasio pueda ser eficaz para compensar una reducción en el contenido de cloruro del medio.

- En una realización, la presente invención incluye un método para producción de ácido docosahexaenoico (DHA) por cultivo de microalgas heterótrofas de la clase Dinofíceas en un medio de cultivo. El medio comprende ion cloruro a una concentración menor que o igual a aproximadamente 2 g/l e ion potasio a una concentración mayor que o igual
45 a aproximadamente 0,25 g/l. En esta realización, la microalga produce al menos aproximadamente 0,04 g DHA por litro de un cultivo de 7 días. Un cultivo de 7 días tiene por regla general aproximadamente 5×10^6 células/ml o aproximadamente 5×10^9 células/litro. Por consiguiente, un cultivo que tenga aproximadamente 0,2 g/l de DHA al cabo de 7 días contiene aproximadamente 0,04 g DHA/ 10^9 células. En una realización preferida, la microalga es del género *Crypthecodinium*. Una microalga más preferida es *Crypthecodinium cohnii*. Preferiblemente, la concentración de ion cloruro es menor que o igual a aproximadamente 1 g/l, aún más preferiblemente menor que o igual a aproximadamente 0,3 g/l. Preferiblemente, el ion potasio es mayor que o igual a aproximadamente 0,4 g/l, y aún más preferiblemente es igual a o mayor que aproximadamente 0,8 g/l. Preferiblemente, la fuente de ion potasio es sulfato de potasio. En una realización preferida, el medio comprende adicionalmente una fuente de ion sodio tal que la concentración de ion sodio es desde aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 8 g/l. Más preferiblemente, el ion
55 sodio es desde aproximadamente 1,5 g/l a aproximadamente 5 g/l. Una fuente preferida de ion sodio es sulfato de sodio. Se incluye en la presente invención una biomasa producida por este método.

En otra realización, la presente invención incluye un método de producción de DHA por cultivo de microalgas heterótrofas de la clase Dinofíceas en un medio de cultivo. El medio comprende ion cloruro a una concentración menor que o igual a aproximadamente 2 g/l, ion potasio a una concentración mayor que o igual a aproximadamente

0,25 g/l e ion sodio presente en una ratio menor que o igual a aproximadamente 27:1 peso:peso sodio:potasio. En esta realización, la microalga produce al menos aproximadamente 0,2 g DHA por litro de cultivo de 7 días o 0,04 g DHA 10^9 células. En una realización preferida, la microalga es del género *Crypthecodinium*. Una microalga más preferida es *Crypthecodinium cohnii*. Preferiblemente, la concentración de ion cloruro es menor que o igual a aproximadamente 1 g/l, aún más preferiblemente menor que o igual a aproximadamente 0,3 g/l. Preferiblemente, el ion potasio es mayor que o igual a aproximadamente 0,4 g/l, y aún más preferiblemente es igual a o mayor que aproximadamente 0,8 g/l. Preferiblemente, la fuente de ion potasio es sulfato de potasio. El medio comprende adicionalmente una fuente de ion sodio tal que el ion sodio está presente en el medio en una ratio menor que 27 veces (en peso) en peso de ion potasio (expresada como 27:1 sodio:potasio peso/peso). En una realización preferida, la ratio sodio:potasio es menor que aproximadamente 15:1. Es más preferida una ratio sodio:potasio de aproximadamente 4:1. Una fuente preferida de ion sodio es sulfato de sodio. En la presente invención se incluye una biomasa producida por este método.

Los autores de la presente invención han identificado también condiciones del medio de cultivo y cepas que permiten que *Crypthecodinium* crezca en un medio con niveles de pH sustancialmente reducidos, mientras que se mantiene todavía una tasa comercialmente práctica de crecimiento y producción de lípidos, con inclusión de DHA. Se describe adicionalmente un método de producción de DHA por cultivo de microalgas heterótrofas de la clase Dinofíceas en un medio de cultivo, en donde el medio de cultivo tiene un pH menor que aproximadamente 6, y en donde la microalga produce al menos aproximadamente 0,04 g DHA/ 10^9 células. El medio puede comprender además ion cloruro a una concentración menor que o igual a aproximadamente 2 g/l, ion potasio a una concentración mayor que o igual a aproximadamente 0,25 g/l e ion sodio presente en una ratio menor que o igual a aproximadamente 27:1 peso:peso sodio:potasio. En esta realización, la microalga produce al menos aproximadamente 0,04 g DHA/ 10^9 células. En una realización preferida, la microalga es del género *Crypthecodinium*. Una microalga más preferida es *Crypthecodinium cohnii*. En una realización preferida, el pH es menor que o igual a aproximadamente pH 5,5, siendo más preferiblemente menor que o igual a aproximadamente 5,0, y aún más preferiblemente menor que o igual a aproximadamente 4,5. En una realización preferida, el medio comprende además una concentración de ion cloruro menor que o igual a aproximadamente 2 g/l, preferiblemente menor que o igual a aproximadamente 1 g/l, aún más preferiblemente menor que o igual a aproximadamente 0,3 g/l. El medio comprende también ion potasio en concentraciones mayores que o iguales a aproximadamente 0,25 g/l, mayores que o iguales a aproximadamente 0,4 g/l, y aún más preferiblemente es mayor que o igual a aproximadamente 0,8 g/l. Preferiblemente, la fuente de ion potasio es sulfato de potasio. En una realización preferida, el medio comprende además una fuente de ion sodio tal que la concentración de ion sodio es desde aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 8 g/l. Más preferiblemente, el ion sodio es desde aproximadamente 1,5 g/l a aproximadamente 5 g/l. Una fuente preferida de ion sodio es sulfato de sodio. Se incluye en la presente invención una biomasa producida por este método.

Se describe adicionalmente un método para la selección de una microalga heterótrofa tolerante a pH bajo de la clase Dinofíceas, que comprende subcultivar dicha microalga en medios de pH bajo hasta que la producción de DHA es mayor que o igual a aproximadamente 0,04 g DHA/ 10^9 células. En una realización preferida, el pH es menor que o igual a aproximadamente 6, es menor que o igual a aproximadamente 5, es menor que o igual a aproximadamente 4,5. Se incluye en la presente invención la microalga y una biomasa producida por este método.

Estos y otros objetos, características, y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción del modo óptimo siguiente, los dibujos y las reivindicaciones.

Breve Descripción de las Figuras

Fig. 1 es una representación gráfica de una evolución en el tiempo de la producción de DHA para duplicados de la cepa T-HF de *C. cohnii* cultivada a pH 6,3 y 3 g/l de ion cloruro (designado SSM de pH 6,3) y la cepa T-HF de *C. cohnii*, adaptada a pH bajo, cultivada a pH 5 y 1 g/l de ion cloruro (designada LCSSI de pH 5,0).

Fig. 2 es una representación gráfica de una evolución temporal de la producción de DHA para duplicados de la cepa T-HF de *C. cohnii* cultivada a pH 6,3 y 3 g de ion cloruro (designada SSM de pH 6,3) y la cepa T-HF de *C. cohnii*, adaptada a pH bajo, cultivada a pH 4,5 and 1 g/l de ion cloruro (designada LCSSI de pH 5,0).

Descripción de la Invención

La presente invención resuelve el problema arriba identificado de corrosión de los fermentadores causada por los niveles elevados de cloruro de sodio utilizados para el cultivo de microalgas marinas de la clase Dinofíceas. Los inventores han descubierto componentes del medio de cultivo que permiten niveles comercialmente viables de crecimiento de microalgas marinas de la clase Dinofíceas y la producción de DHA en condiciones pobres en cloruro de sodio, por utilización de cantidades modificadas de iones cloruro y potasio en el medio de cultivo. Más específicamente, los inventores han descubierto que la pérdida de sodio causada por reducción del cloruro de sodio a niveles no corrosivos puede ser contrarrestada al menos parcialmente por aumento de los niveles de potasio en el medio de cultivo.

Se resuelve también el problema arriba identificado consistente en hacer posible el crecimiento de una microalga marina de la clase Dinofíceas mientras se evita simultáneamente el crecimiento de bacterias. Más específicamente, se describen métodos para cultivar organismos marinos de tal modo que los mismos se vuelven tolerantes a pH bajo. Se describen también cepas de tales microorganismos que son tolerantes a pH bajo. Las cepas tolerantes a

5

Una realización de la presente invención incluye un método para producir ácido docosahexaenoico (DHA) por cultivo de microalgas heterótrofas de la clase Dinofíceas en un medio de cultivo que incluye los componentes siguientes: ion cloruro a una concentración menor que aproximadamente 2 g/l, e ion potasio a una concentración mayor que aproximadamente 0,25 g/l, donde las microalgas producen al menos aproximadamente 0,2 g DHA por litro de cultivo de 7 días. El cultivo de 7 días tiene generalmente 5×10^6 células/ml dando como resultado aproximadamente 0,04 g DHA/ 10^9 células. En realizaciones preferidas, las microalgas heterótrofas producen al menos aproximadamente 0,04 g DHA/ 10^9 células, al menos aproximadamente 0,06 g DHA/ 10^9 células, al menos aproximadamente 0,08 g DHA/ 10^9 células, al menos aproximadamente 0,10 g DHA/ 10^9 células, al menos aproximadamente 0,12 g DHA/ 10^9 células, al menos aproximadamente 0,14 g DHA/ 10^9 células, al menos aproximadamente 0,16 g DHA/ 10^9 células, al menos aproximadamente 0,18 g DHA/ 10^9 células, al menos aproximadamente 0,20 g DHA/ 10^9 células, al menos aproximadamente 0,22 g DHA/ 10^9 células, al menos aproximadamente 0,24 g DHA/ 10^9 células, al menos

10

15

20

aproximadamente 0,26 g DHA/ 10^9 células, al menos aproximadamente 0,28 g DHA/ 10^9 células, o al menos aproximadamente 0,30 g DHA/ 10^9 células. Como se utiliza en esta memoria, la referencia a una concentración de nutrientes en un medio de cultivo se refiere a la concentración de nutrientes en el medio al comienzo del paso de cultivo, que incluye cualesquiera nutrientes arrastrados de etapas previas en el proceso, tales como la preparación de un inóculo.

Los microorganismos adecuados para la presente invención incluyen algas heterótrofas, que incluyen miembros de la clase Dinofíceas (dinoflagelados). Un miembro preferido de esta clase es un miembro del género *Crypthecodinium*. Un miembro preferido del género *Crypthecodinium* es *C. cohnii*. *Crypthecodinium cohnii* es un heterótrofo obligado que requiere una fuente reducida de carbono para crecimiento, y contiene un perfil de ácidos grasos en el cual DHA es el único ácido graso poliinsaturado presente en cantidades apreciables. Microorganismos adecuados pueden obtenerse de cierto número de fuentes disponibles públicamente, con inclusión de recogida del medio natural. Por ejemplo, la American Type Culture Collection enumera actualmente 45 cepas disponibles de *Crypthecodinium cohnii*, identificadas como ATCC Nos. 30021, 30334-30348, 30541-30543, 30555-30557, 30571, 30572, 30772-30775, 30812, 40750, 50050-50060, y 50297-50300. Como se utiliza en esta memoria, cualquier microorganismo, o cualquier tipo específico de organismo incluye cepas salvajes, mutantes, o tipos recombinantes.

25

30

Además de las concentraciones de sodio, cloruro y potasio que son el objeto de la presente invención y se exponen con mayor detalle más adelante, otros componentes de los medios de la presente invención pueden ser cualesquiera componentes conocidos en la técnica que promuevan el crecimiento y la producción de DHA a niveles comercialmente practicables, e incluyen componentes tales como los expuestos en la Patente U.S. No. 5,130,242, Patente U.S. No. 5,407,957, Patente U.S. No. 5,397,591; Patente U.S. No. 5,492,938; y Patente U.S. No. 5,711,983, todas las cuales se incorporan por referencia en esta memoria en su totalidad. De modo más específico, puede utilizarse una fuente de carbono, tal como glucosa, diversos almidones, melazas, almidón triturado y análogos. Se incluye también en el medio de cultivo una fuente asimilable de nitrógeno orgánico o inorgánico. Las fuentes de nitrógeno pueden incluir nitrato, urea, sales de amonio, aminoácidos y análogos. Puede proporcionarse también una fuente asimilable de fósforo. El medio puede contener también una fuente de factores de crecimiento microbianos, que son compuestos no especificados o especificados que mejoran el crecimiento heterótrofo de los microorganismos unicelulares, y pueden incluir levadura u otros extractos, extractos de suelo, y análogos. Ejemplos específicos de medios de crecimiento para *C. cohnii* y organismos afines, por ejemplo, pueden encontrarse también en Jiang y Chen, Process Biochemistry 35 (2000) 1205-1209; Jiang y Chen, Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, (1999) Vol. 23, 508-513; Vazhappilly y Chen, Journal of the American Oil Chemists Society, (1998) Vol. 75, No. 3 p 393-397. Ejemplos específicos de medios preferidos para utilización con la presente invención pueden encontrarse, por ejemplo, en la sección de Ejemplos más adelante en esta memoria.

35

40

45

50

En un aspecto de los medios de la presente invención, las concentraciones de ion cloruro están presentes en una concentración menor que o igual a aproximadamente 2000 ppm o aproximadamente 2 gramos por litro de cultivo, más preferiblemente menor que o igual a aproximadamente 1,9 g/l, más preferiblemente menor que o igual a aproximadamente 1,8 g/l, más preferiblemente menor que o igual a aproximadamente 1,7 g/l, más preferiblemente menor que o igual a aproximadamente 1,6 g/l, más preferiblemente menor que o igual a aproximadamente 1,5 g/l, más preferiblemente menor que o igual a aproximadamente 1,4 g/l, más preferiblemente menor que o igual a aproximadamente 1,3 g/l, más preferiblemente menor que o igual a aproximadamente 1,2 g/l, más preferiblemente menor que o igual a aproximadamente 1,1 g/l, más preferiblemente menor que o igual a aproximadamente 1,0 g/l, más preferiblemente menor que o igual a aproximadamente 0,9 g/l, más preferiblemente menor que o igual a aproximadamente 0,8 g/l, más preferiblemente menor que o igual a aproximadamente 0,7 g/l, más preferiblemente menor que o igual a aproximadamente 0,6 g/l, más preferiblemente menor que o igual a aproximadamente 0,5 g/l, más

55

60

preferiblemente menor que o igual a aproximadamente 0,4 g/l, y muy preferiblemente menor que o igual a aproximadamente 0,3 g/l. En realizaciones alternativas, la concentración mínima de cloruro es al menos aproximadamente 0,025 g/l, al menos aproximadamente 0,05 g/l, o al menos aproximadamente 0,1 g/l. El componente ion cloruro del medio se deriva preferiblemente de una sal cloruro, siendo una sal preferida cloruro de sodio. Otras fuentes de cloruro en el medio incluyen cloruro de potasio y cloruro de calcio. Las fuentes de ion cloruro pueden incluir más de un compuesto que contenga cloruro en el medio, y pueden incluir ácido clorhídrico, que puede utilizarse para ajustar el pH del medio, así como $MnCl_2$ y $FeCl_3$.

En otro aspecto del medio de la presente invención, la concentración de ion potasio es mayor que aproximadamente 0,25 g/l. El ion potasio está presente generalmente a niveles bajos en el agua de mar, siendo aproximadamente 0,38 g/l de agua de mar. El medio de cultivo conocido en la técnica para crecimiento de microalgas marinas sigue estrechamente la composición de agua de mar, siendo generalmente los niveles de ion potasio iguales o inferiores. Por ejemplo, Tuttle y Loeblich (1975) dan a conocer 9 mM KCl, que es el equivalente de aproximadamente 0,35 g/l de ion potasio. En Handbook of Phycological Methods (Janet R. Stein, Ed., Cambridge University Press, 1973), se expone que el ion potasio en el medio es 9,83 mM como cloruro de potasio, que es el equivalente de aproximadamente 0,36 g/l de ion potasio. En una realización, la presente invención incluye ion potasio a una concentración mayor que aproximadamente 0,39 g/l. Los presentes inventores han encontrado que, una vez que el ion potasio es mayor que un nivel umbral, los cultivos son relativamente insensibles a la concentración precisa de ion potasio, desarrollándose bien y produciendo niveles comercialmente viables de DHA en un intervalo de concentraciones de ion potasio. Preferiblemente, el intervalo inferior de concentración de ion potasio es al menos aproximadamente 0,2 g/l, al menos aproximadamente 0,25 g/l, al menos aproximadamente 0,3 g/l, al menos aproximadamente 0,35 g/l, al menos aproximadamente 0,4 g/l, al menos aproximadamente 0,45 g/l, al menos aproximadamente 0,5 g/l, al menos aproximadamente 0,6 g/l, y al menos aproximadamente 0,7 g/l. Preferiblemente, el intervalo superior de la concentración de ion potasio es como máximo aproximadamente 10 g/l, como máximo aproximadamente 6 g/l, como máximo aproximadamente 4 g/l, como máximo aproximadamente 3 g/l, como máximo aproximadamente 2,8 g/l, como máximo aproximadamente 2,6 g/l, como máximo aproximadamente 2,4 g/l, como máximo aproximadamente 2,2 g/l, como máximo aproximadamente 2 g/l, como máximo aproximadamente 1,9 g/l, como máximo aproximadamente 1,8 g/l, como máximo aproximadamente 1,7 g/l, como máximo aproximadamente 1,6 g/l, como máximo aproximadamente 1,5 g/l, y como máximo aproximadamente 1 g/l. Concentraciones muy preferidas de ion potasio son aproximadamente 0,75 g/l, 0,8 g/l, 0,85 g/l, 0,9 g/l, y 0,95 g/l. Intervalos preferibles para ion potasio son entre aproximadamente 0,45 g/l y aproximadamente 1,5 g/l; más preferiblemente entre aproximadamente 0,5 g/l y aproximadamente 1,2 g/l; más preferiblemente entre aproximadamente 0,6 g/l y aproximadamente 1 g/l; aún más preferiblemente entre aproximadamente 0,7 g/l y aproximadamente 0,9 g/l; y de modo muy preferible aproximadamente 0,8 g/l.

La fuente de ion potasio puede proceder de cualquier sal de potasio compatible con cultivo de células y en particular de microalgas de la clase Dinofíceas. El ion potasio puede derivarse de una mixtura de sales en el medio. Las sales de potasio preferidas incluyen cloruro de potasio, sulfato de potasio, acetato de potasio, bicarbonato de potasio, fosfato de potasio, entre otras. Una fuente preferida de ion potasio es sulfato de potasio.

En un aspecto de la presente invención, la cantidad de DHA producida a partir de los cultivos en la recolección es mayor que la cantidad de producción de DHA a partir de cultivos que no crecen en medios de la presente invención. En una realización, la producción de DHA utilizando concentraciones bajas de cloruro con empleo de los procesos de la presente invención es al menos 0,2 gramos DHA por litro de cultivo de 7 días o 0,04 g DHA/10⁹ células.

En otro aspecto de la presente invención, el medio contendrá también fuentes adicionales de ion sodio distintas de cloruro de sodio. Los presentes inventores han encontrado que los niveles de ion sodio no son críticos para la presente invención. Los cultivos de organismos marinos de la presente invención son relativamente insensibles a la concentración precisa de ion sodio, creciendo satisfactoriamente y produciendo niveles comercialmente viables de DHA en un intervalo de concentraciones de ion sodio. Muchas fuentes diferentes de ion sodio son compatibles con la presente invención, con inclusión de sulfato de sodio, carbonato de sodio, hidrogenocarbonato de sodio, y acetato de sodio. Una fuente preferida de ion sodio adicional es sulfato de sodio. En una realización preferida, el medio contiene al menos aproximadamente 1 g/l de ion sodio hasta aproximadamente 8 g/l de ion sodio. En el extremo inferior del intervalo, la concentración preferida de ion sodio es al menos aproximadamente 1 g/l, al menos aproximadamente 1,5 g/l, al menos aproximadamente 2 g/l, y al menos aproximadamente 2,5 g/l. Preferiblemente, el intervalo superior de la concentración de ion sodio es como máximo aproximadamente 15 g/l, como máximo aproximadamente 12 g/l, como máximo aproximadamente 10 g/l, como máximo aproximadamente 9 g/l, como máximo aproximadamente 8 g/l, como máximo aproximadamente 7 g/l, como máximo aproximadamente 6 g/l, como máximo aproximadamente 5,5 g/l, como máximo aproximadamente 5 g/l, como máximo aproximadamente 4,5 g/l, como máximo aproximadamente 4 g/l. Concentraciones muy preferidas de ion sodio son aproximadamente 2,75 g/l, 3 g/l, 3,25 g/l, 3,5 g/l, y 3,75 g/l. Intervalos preferibles para ion sodio están comprendidos entre aproximadamente 1,5 g/l y aproximadamente 7,5 g/l, siendo aún más preferidos aproximadamente 2,0 g/l hasta aproximadamente 6 g/l, y siendo un intervalo aún más preferido mayor que aproximadamente 2,5 g/l hasta aproximadamente 5 g/l. En las realizaciones más preferidas, el ion sodio es al menos aproximadamente 3 g/l a aproximadamente 3,5 g/l. El nivel más preferido de sodio es aproximadamente 3,25 g/l. Como se ha descrito previamente, los cultivos son relativamente insensibles a los niveles precisos de sodio, y por

tanto pueden utilizarse niveles mayores aún. Sin embargo, una vez que se utilizan niveles de sodio superiores a aproximadamente 8 g/l, los rendimientos del cultivo comienzan a descender ligeramente.

- 5 En otra realización, la presente invención incluye un método de producción de DHA por cultivo de microalgas heterótrofas de la clase Dinofíceas en un medio de cultivo. El medio comprende ion cloruro en una concentración menor que o igual a aproximadamente 2 g/l, ion potasio a una concentración mayor que o igual a aproximadamente 0,25 g/l e ion sodio presente en una ratio menor que o igual a aproximadamente 27:1 peso:peso sodio:potasio. En esta realización, la microalga produce al menos aproximadamente 0,2 g DHA por litro de cultivo de 7 días o 0,04 g DHA/10⁹ células. En esta realización, el medio de cultivo contiene ion sodio en una ratio con ion potasio menor que o igual a aproximadamente 27:1, peso:peso. En el agua de mar, la ratio de ion sodio a ion potasio es aproximadamente 27,3:1. Dicho de otro modo, la cantidad de ion sodio es aproximadamente 27,3 veces mayor que la cantidad de ion potasio. En la presente invención, los inventores han encontrado que al aumentar el ion potasio con relación al ion sodio aumenta la producción de DHA a partir del cultivo. Una ratio preferida de ion sodio a ion potasio es menor que o igual a aproximadamente 27:1, menor que o igual a aproximadamente 25:1, menor que o igual a aproximadamente 23:1, menor que o igual a aproximadamente 21:1, y menor que o igual a aproximadamente 19:1. Son más preferidas ratios menores que o iguales a aproximadamente 17:1, menores que o iguales a aproximadamente 15:1, menores que o iguales a aproximadamente 13:1, menores que o iguales a aproximadamente 11:1. Son aún más preferidas ratios menores que o iguales a aproximadamente 9:1, menores que o iguales a aproximadamente 7:1, o menores que o iguales a aproximadamente 5:1. Una ratio preferida es aproximadamente 4:1.
- 10 Se describe adicionalmente un método de producción de DHA por cultivo de microalgas heterótrofas de la clase Dinofíceas en un medio de cultivo, en donde el medio de cultivo tiene un pH menor que aproximadamente 6, y en donde las microalgas producen al menos aproximadamente 0,2 g DHA por litro de cultivo de 7 días o 0,04 g DHA/10⁹ células. En una realización preferida, el pH es menor que o igual a aproximadamente 5,5, y más preferiblemente menor que o igual a aproximadamente 5. En una realización preferida, el pH es menor que o igual a aproximadamente 4,5. En una realización preferida, el medio comprende adicionalmente una concentración de ion cloruro menor que o igual a 2 g/l, preferiblemente menor que o igual a aproximadamente 1 g/l, aún más preferiblemente menor que o igual a aproximadamente 0,3 g/l. El medio comprende también preferiblemente ion potasio en concentraciones mayores que o iguales a aproximadamente 0,25 g/l, mayores que o iguales a aproximadamente 0,4 g/l, y aún más preferiblemente es mayor que o igual a aproximadamente 0,8 g/l.
- 15 Preferiblemente, la fuente de ion potasio es sulfato de potasio. En una realización preferida, el medio comprende adicionalmente una fuente de ion sodio tal que la concentración de ion sodio es desde aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 8 g/l. Más preferiblemente, el ion sodio es desde aproximadamente 1,5 g/l a aproximadamente 5 g/l. Una fuente preferida de ion sodio es sulfato de sodio. Se incluye en esta realización una biomasa producida por este método.
- 20 Se describe adicionalmente un método para la preparación de cepas tolerantes a pH bajo de especies de la clase Dinofíceas y cepas producidas por el mismo. Los métodos incluyen la preparación de medios de pH bajo y el subcultivo de la especie de Dinofíceas deseada hasta que el cultivo produce una cantidad deseada de DHA. El subcultivo puede llevarse a cabo de la manera siguiente. Un inóculo de la especie de Dinofíceas deseada se pone en el medio de pH bajo y se deja crecer durante un periodo de tiempo definido, preferiblemente 7 días. El periodo de tiempo no es crítico, pero debería seleccionarse de tal modo que la cepa tenga tiempo suficiente para crecer, pero antes que alcance la senescencia. Se calcula la producción de DHA del cultivo. Si es menor que la cantidad deseada, se realiza un subcultivo adicional de la manera siguiente. Se prepara un medio nuevo de pH bajo y se inocula con el cultivo de pH bajo cultivado, y se incuba durante un periodo de tiempo apropiado. Se calcula la producción de DHA del cultivo. Si la producción de DHA es menor que la cantidad deseada, se repite el subcultivo hasta que se alcanza la producción de DHA deseado. Un pH preferido para seleccionar la tolerancia al mismo es igual o inferior a aproximadamente 6, más preferiblemente igual o menor que aproximadamente 5,5, aún más preferiblemente igual o menor que aproximadamente 5, y todavía más preferiblemente igual o inferior a 4,5. El medio en el cual se lleva a cabo este método es cualquier medio de cultivo conocido en la técnica, con el pH ajustado a los niveles deseados. Un medio preferido en el que llevar a cabo el subcultivo es el medio descrito en el Ejemplo 1.
- 25 30 35 40 45 50 55 60
- Condiciones de cultivo consistentes con los organismos y métodos de la presente invención pueden lograrse por métodos conocidos en la técnica e incluyen los métodos dados a conocer en las Patentes U.S. 5.130.242, Patente U.S. No. 5.407.957, Patente U.S. No. 5.397.591; Patente U.S. No. 5.492.938; y Patente U.S. No. 5.711.983, y las condiciones óptimas pueden ser determinadas fácilmente por los expertos en la técnica. Resumidamente, el cultivo puede realizarse en cualquier fermentador adecuado, preferiblemente en un fermentador de tanque agitado o en un fermentador con elevador de aire, que proporciona una fuente de para los microorganismos. La agitación del microorganismo debería mantenerse a un nivel tal que si bien las concentraciones de oxígeno disuelto son suficientes para soportar el crecimiento del cultivo y la producción de DHA, la agitación no cizalle o deteriore de ningún otro modo los microorganismos. Niveles preferidos de oxígeno disuelto son al menos 10% del nivel de saturación de aire. Más preferiblemente, los niveles de oxígeno disueltos se mantienen entre aproximadamente 10% y aproximadamente 50% de los niveles de saturación de aire.

El cultivo puede llevarse a cabo a cualquier temperatura que mantenga la vida. Generalmente, los microorganismos crecerán a temperaturas que van desde aproximadamente 15°C a aproximadamente 34°C. Preferiblemente, la temperatura se mantiene entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 28°C.

5 Los organismos pueden cosecharse por medios convencionales, conocidos por los expertos en la técnica, tales como centrifugación, floculación, o filtración, y pueden procesarse inmediatamente o secarse para procesamiento futuro. En cualquier caso, el lípido puede extraerse. Como se utiliza en esta memoria, el término "lípido" incluye fosfolípidos; ácidos grasos libres; ésteres de ácidos grasos; triacilgliceroles; diacilglicéridos; monoacilglicéridos; lisofosfolípidos; jabones; fosfátidos; esteroides y ésteres de esteroles; carotenoides; xantofilas (v.g., oxicarotenoides); hidrocarburos, y otros lípidos conocidos por una persona con experiencia ordinaria en la técnica. Como es bien conocido por el artesano experto, el DHA al que se hace referencia en la presente invención puede encontrarse en la forma de estos diversos lípidos, y no está limitado al ácido graso libre. Pueden extraerse diferentes tipos o componentes de los lípidos, dependiendo de la técnica de extracción que se utilice. Los lípidos pueden extraerse con una cantidad eficaz de disolvente. Disolventes adecuados pueden ser determinados por los expertos en la técnica. Los lípidos polares (v.g., fosfolípidos) se extraen generalmente con disolventes polares (v.g., cloroformo/metanol) y los lípidos neutros (v.g., triacilgliceroles) se extraen con disolventes no polares (v.g., hexano). Un disolvente preferido es hexano puro. Una ratio adecuada de hexano a biomasa seca es aproximadamente 4 litros de hexano por kilogramo de biomasa seca. El hexano se mezcla preferiblemente con la biomasa en una vasija de reacción agitada a una temperatura de aproximadamente 50°C durante aproximadamente 2 horas. Después de la mezclado, la biomasa se filtra y se separa del hexano que contiene el aceite. El hexano se separa del aceite por métodos de destilación conocidos por los expertos en la técnica. El equipo de procesamiento convencional de semillas oleaginosas es adecuado para realizar la filtración, separación y destilación. Pasos adicionales de procesamiento, conocidos por los expertos en la técnica, pueden llevarse a cabo en caso requerido o deseable para una aplicación particular. Métodos alternativos para recuperación de lípidos se describen en las referencias siguientes que se incorporan por referencia en esta memoria en su totalidad: Publicación PCT WO 0176715, titulada "Method for the Fractionation of Oil and Polar Lipid-Containing Native Raw Materials"; Publicación PCT WO 0176385, titulada "Method For The Fractionation Of Oil And Polar Lipid-Containing Native Raw Materials Using Alcohol And Centrifugation"; Publicación PCT WO 0153512, titulada "Solventless Extraction Process."

30 Debe entenderse que la presente invención, si bien se describe en términos de organismos y métodos específicos, incluye la totalidad de tales métodos y cepas que pueden obtenerse y son útiles de acuerdo con la doctrina expuesta en esta memoria, con inclusión de la totalidad de tales sustituciones, modificaciones y optimizaciones que serían recursos disponibles para las personas con experiencia ordinaria en la técnica. Los ejemplos que siguen y los resultados de los ensayos se proporcionan para los propósitos de ilustración y no deben entenderse como limitantes del alcance de la invención.

Ejemplo 1

35 Este Ejemplo describe la preparación de Medio de Cribado Estándar (SSM) con 4,5 g/l de NaCl. Para preparar el medio, el primer paso incluye añadir los compuestos siguientes a agua destilada hasta 90% del volumen final deseado, como se muestra en la Tabla 1. Todos los compuestos están disponibles de Sigma Aldrich, St. Louis, MO.

Tabla 1. Cantidades y Concentraciones Finales de medio antes del tratamiento en autoclave

Compuesto	Concentración Final	Cantidad de ion cloruro añadida (g/l)	Cantidad de ion potasio añadida (g/l)	Cantidad de ion sodio añadida (g/l)
CaCl ₂ -2H ₂ O ¹	0,3 g/l	0,09		
MgSO ₄ -7H ₂ O	1,25 g/l			
NaCl	4,5 g/l	3		1,5
MES	10,7 g/l			
MSG	1,5 g/l			
Tastone 154	0,5 g/l			
KH ₂ PO ₄	0,014 g/l		0,004	
KCl	0,14 g/l	0,067	0,073	
CuSO ₄ -5H ₂ O	0,15 X 10 ⁻³ g/l			
CoCl ₂ -6H ₂ O	0,3 X 10 ⁻³ g/l	insignificante		
H ₃ BO ₃	10 X 10 ⁻³ g/l			
MnCl ₂ -4H ₂ O	4,5 X 10 ⁻³ g/l	insignificante		

ES 2 454 196 T3

ZnSO ₄ -7H ₂ O	0,3 X 10 ⁻³ g/l			
NaOH (para ajustar el pH a 6,3)	1,16 g/l			0,67
FeCl ₂ ²	6 X 10 ⁻³ g/ml	insignificante		
Tiamina ³	1 X 10 ⁻³ g/l			
Biotina ³	2 X 10 ⁻⁶ g/l			
Glucosa ⁴	50 g/l			
Total de cada ion		3,16	0,08	2,17

¹ El cloruro de calcio dihidratado contiene 244 g/mol con 28,7% de cloruro.

² Solución stock tratada en autoclave por separado y añadida de manera estéril al medio después del tratamiento en autoclave; producida nueva cada dos semanas.

5 ³ Solución stock esterilizada por filtración a través de un filtro de 0,2 micrómetros; guardada a 4°C en la oscuridad. Añadida de manera estéril al medio después del tratamiento en autoclave.

⁴ Solución stock tratada en autoclave por separado. Añadida de manera estéril al medio después del tratamiento en autoclave.

10 El medio tratado en autoclave se lleva hasta 100% en volumen con agua estéril. Para experimentos de cribado, se añaden 35 ml de medio SSM a matraces Erlenmeyer estériles de 250 ml. Se añade 1 ml de inóculo por matraz para una concentración inicial de células 1 x 10⁵ células por ml. El inóculo es de un cultivo de 5-6 días de antigüedad. Los cultivos se dejan crecer a 26,5°C en una máquina de sacudidas rotativo a 135 rpm.

Ejemplo 2

15 Este Ejemplo describe la preparación de un Medio de Cribado con 1000 ppm de ion cloruro (SSM) con 1,41 g/l de NaCl (que junto con cloruro de calcio y cloruro de potasio da como resultado aproximadamente 1000 ppm, 1 g/l de ion cloruro). Para preparar el medio, el primer paso incluye añadir los compuestos siguientes a agua destilada desionizada hasta 90% del volumen final deseado como se muestra en la Tabla 2. Todos los compuestos están disponibles de Sigma Aldrich, St. Louis, MO.

Tabla 2. Cantidades y Concentraciones Finales de medio antes de tratamiento en autoclave

Compuesto	Concentración Final	Cantidad de ion cloruro añadida (g/l)	Cantidad de ion potasio añadida (g/l)	Cantidad de ion sodio añadida (g/l)
CaCl ₂ -2H ₂ O	0,3 g/l	0,09		
MgSO ₄ -7H ₂ O	1,25 g/l			
NaCl	1,41 g/l	0,85		0,47
MES	10,7 g/l			
MSG	1,5 g/l			
Tastone 154	0,5 g/l			
KH ₂ PO ₄	0,014 g/l		0,004	
KCl	0,14 g/l	0,067	0,073	
CuSO ₄ -5H ₂ O	0,15 X 10 ⁻³ g/l			
CoCl ₂ -6H ₂ O	0,3 X 10 ⁻³ g/l	insignificante		
H ₃ BO ₃	10 X 10 ⁻³ g/l			
MnCl ₂ -4H ₂ O	4,5 X 10 ⁻³ g/l	insignificante		
ZnSO ₄ -7H ₂ O	0,3 X 10 ⁻³ g/l			
NaOH (para ajustar el pH a 6,3)	1,6 g/l			0,67
FeCl ₂ ¹	6 X 10 ⁻³ g/l	insignificante		
Tiamina ²	1 X 10 ⁻³ g/l			

ES 2 454 196 T3

Biotina ²	2 X 10 ⁻⁶ g/l			
Glucosa ³	50 g/l			
Total de cada ion		1,00	0,08	1,14

¹ Solución stock tratada en autoclave por separado y añadida de manera estéril al medio después del tratamiento en autoclave; preparada nueva cada dos semanas.

² Solución stock esterilizada por filtración a través de un filtro de 0,2 micrómetros; guardada a 4°C en la oscuridad. Añadida de manera estéril al medio después del tratamiento en autoclave.

5 ³ Solución stock tratada en autoclave por separado. Añadida de manera estéril al medio después del tratamiento en autoclave.

Se lleva el medio tratado en autoclave hasta 100% del volumen con agua estéril. Para experimentos de cribado, se añaden 35 ml de medio SSM a matraces Erlenmeyer estériles de 250 ml. Se añade 1 ml de inóculo por matraz para una concentración inicial de células de 1 x 10⁵ células por ml. El inóculo es de un cultivo de 5 a 6 días de antigüedad. Los cultivos se dejan crecer a 26,5°C en una máquina de sacudidas rotativo a 135 rpm.

10 Ejemplo 3

Este Ejemplo describe la preparación de Medio de Cribado (SSM) con 300 ppm de ion cloruro que contiene 0,211 g/l de NaCl (que junto con cloruro de calcio y cloruro de potasio da como resultado 0,3 g/l de ion cloruro). Para preparar el medio, el primer paso incluye añadir los compuestos siguientes a agua destilada y desionizada hasta 90% del volumen final deseado como se muestra en la Tabla 3. Todos los compuestos están disponibles de Sigma Aldrich, St. Louis, MO.

15

Tabla 3. Cantidades y Concentraciones Finales de medio antes de tratamiento en autoclave

Compuesto	Concentración Final	Cantidad de ion cloruro añadida (g/l)	Cantidad de ion potasio añadida (g/l)	Cantidad de ion sodio añadida (g/l)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,3 g/l	0,09		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,25 g/l			
NaCl	0,211 g/l	0,13		0,07
MES	10,7 g/l			
MSG	1,5 g/l			
Tastone 154	0,5 g/l			
KH ₂ PO ₄	0,014 g/l		0,004	
KCl	0,14 g/l	0,067	0,073	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,15 X 10 ⁻³ g/l			
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,3 X 10 ⁻³ g/l	insignificante		
H ₃ BO ₃	10 X 10 ⁻³ g/l			
MnCl ₂ ·4H ₂ O	4,5 X 10 ⁻³ g/l	insignificante		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,3 X 10 ⁻³ g/l			
NaOH (para ajustar el pH a 6,3)	1,16 g/l			0,67
FeCl ₂ ¹	6 X 10 ⁻³ g/l	insignificante		
Tiamina ²	1 X 10 ⁻³ g/l			
Biotina ²	2 X 10 ⁻⁶ g/l			
Glucosa ³	50 g/l			
Total de cada ion		0,30	0,08	0,74

¹ Solución stock tratada en autoclave por separado y añadida de manera estéril al medio después del tratamiento en autoclave; preparada nueva cada dos semanas.

² Solución stock esterilizada por filtración a través de un filtro de 0,2 micrómetros; guardada a 4°C en la oscuridad. Añadida de manera estéril al medio después del tratamiento en autoclave.

20

ES 2 454 196 T3

³ Solución stock tratada en autoclave por separado. Añadida de manera estéril al medio después del tratamiento en autoclave.

Se lleva el medio tratado en autoclave hasta 100% de su volumen con agua estéril. Para experimentos de cribado, se añaden 35 ml de medio SSM a matraces Erlenmeyer estériles de 250 ml. Se añade 1 ml de inóculo por matraz para una concentración inicial de células de 1×10^5 células por ml. El inóculo es de un cultivo de 5-6 días de antigüedad. Los cultivos se dejan crecer a 26,5°C en una máquina de sacudidas rotativo a 135 rpm.

Ejemplo 4

Este Ejemplo describe el procedimiento para Crecimiento y Cosecha de *Cryptocodinium cohnii* en SSM de pH 6,3.

El medio SSM se preparó como se describe en uno de los Ejemplos 1-3, dependiendo de qué medio se estuviera ensayando. Se prepararon los componentes adicionales del medio y se añadieron a un medio como el descrito en los Ejemplos 1-3. Todos los pasos anteriores a la cosecha se realizaron en condiciones estériles.

Para preparar el cultivo de inóculo, se utilizaron los procedimientos siguientes. A un matraz Erlenmeyer de 250 ml, se añadieron 49 ml de SSM (descrito en el Ejemplo 1) a un matraz Erlenmeyer de 250 ml. Se añadió 1 ml de un cultivo de 5 días de antigüedad de *C. cohnii*, cepa T-HF (la cepa T-HF identifica el organismo ATCC 40750 que se ha cultivado repetidas veces). El matraz de cultivo se puso en una máquina de sacudidas que giraba a 135 rpm en una incubadora a 27°C en ausencia total de luz. Después de 3 días de crecimiento, el cultivo se desplaza a una vitrina de humos estéril, se aparta 1 ml y se somete a recuento utilizando un Contador Coulter (Contador de Partículas y Analizador de Tamaños Coulter Z2, obtenido de Beckman Coulter, Inc.). El recuento de células se utiliza para calcular la cantidad del cultivo de inóculo que tiene que utilizarse para iniciar un nuevo cultivo de 50 ml a una densidad de células de $1,0 \times 10^5$ células por ml.

Para testar los diferentes componentes del medio, se preparó un medio apropiado como se describe más adelante y se introdujo en un matraz Erlenmeyer estéril de 250 ml. La cantidad de inóculo como se ha calculado previamente se transfirió al matraz de cultivo que contenía el medio preparado en el matraz Erlenmeyer. El matraz de cultivo se puso en una máquina de sacudidas que giraba a 135 rpm en una incubadora a 27°C en ausencia total de luz. Después de 7 días de crecimiento, se cosechó el cultivo como sigue.

Un tubo de centrifuga de 50 ml (obtenido de VWR Scientific) se marcó y se pesó para cada cultivo. Otro tubo de centrifuga de 50 ml se marcó, pero no se pesó, para cada cultivo. El cultivo se vertió luego en el tubo de 50 ml marcado. Se registraron los volúmenes y se realizaron los recuentos de células con el Contador de Partículas y Analizador de Tamaños Coulter Z2. Se determinó el pH.

La mitad del cultivo se vertió en el tubo tarado de 50 ml, y se añadió una solución al 70% de alcohol isopropílico (IPA) para frotamiento a fin de llevar el volumen total en el tubo a 50 ml. El cultivo se mezcló por inversión del tubo 2 ó 3 veces. El cultivo se centrifugó luego a 4000 rpm durante 5 minutos utilizando una Centrifuga Sorvall General Purpose RC-3. Se vertió el sobrenadante. La otra mitad del cultivo se vertió encima del pelet y se repitieron los pasos comenzando con la solución al 70% del IPA. El pelet se lavó luego dos veces con IPA al 39% utilizando el procedimiento siguiente: se añaden al pelet de células 35 ml de IPA al 39%; se agita enérgicamente el tubo (utilizando un Vortex Genie-2 de WR Scientific) a la velocidad total durante 10 segundos; después de la recolección, el pelet se liofilizó finalmente durante al menos 48 horas.

El tubo que contenía el pelet (biomasa) se pesó y se calculó el peso seco de la biomasa. El peso seco se calculó como sigue: se determina el peso del tubo que contiene la biomasa menos el peso de tara del tubo. Este número se divide por el volumen registrado de cultivo en la recolección, dividido por 1000.

La composición de ácidos grasos (y el % de DHA) puede determinarse de acuerdo con los procedimientos descritos en Morrison y Smith, "Preparation of Fatty Acid Methyl Esters and Dimethylacetals from Lipids with Boron Fluoride-Methanol", Journal of Lipid Research, Vol. 5, 1964, y en los American Oil Chemist's Society Official Methods utilizados para cuantificar ácidos grasos de cadena larga y ácido eicosapentaenoico (EPA) y DHA en aceites marinos (Método Celb89). Resumidamente, las muestras se mezclan con cantidades estándar de aceite (patrones internos), se saponifican con hidróxido de sodio metanólico 0,5 N, y se derivatizan con trifluoruro de boro/metanol. Los ésteres metílicos de ácidos grasos se extraen y se analizan en un cromatógrafo de gases con lector de ionización de llama (cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890, Serie II Plus, utilizando una columna de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm (Restek FAMEWAX #12497).

Ejemplo 5

Este ejemplo describe el crecimiento de *C. cohnii* y la producción de DHA a bajos niveles de NaCl utilizando medios de la técnica anterior.

Se preparó 1 litro de SSM que no contenía NaCl, y se trató en autoclave. Se prepararon 4 stocks de NaCl concentrado (135 g/l, 90 g/l, 45 g/l, y 22,5 g/l). Se añadieron a cada matraz de agitación que contenía 48,75 ml de medio SSM sin NaCl y 1,25 ml del stock de NaCl apropiado. Se prepararon dos controles: 4,5 g/l NaCl utilizando

ES 2 454 196 T3

SSM normal como se describe en el Ejemplo 1, y sin NaCl utilizando SSM sin adición de NaCl. Se utilizaron duplicados de cada nivel de NaCl.

Se analizaron el crecimiento y la cosecha como se describe en el Ejemplo 4. La Tabla 5 describe los resultados de este Ejemplo. Todos los números se dan como promedio de dos cultivos.

- 5 Tabla 5. Biomasa, % DHA, % grasa, y producción de DHA para *C. cohnii* cultivado en SSM que contenía cantidades reducidas de NaCl.

NaCl, g/l	ion cloruro ¹ , g/l	biomasa, peso seco, g/l	% DHA en grasa (peso/peso)	% grasa en la biomasa (peso/peso)
4,5	2,73	3,53	51,63	52,45
3,38	2,05	3,66	51,55	47,83
2,25	1,37	3,85	52,19	48,40
1,73	0,68	2,73	54,65	54,59
0,56	0,34	2,70	55,48	48,81
0	0	1,99	51,00	34,19

¹ Refleja la cantidad de ion cloruro (0,20 g/l) a partir de cloruro de sodio exclusivamente. Véanse los Ejemplos 1-3.

La Tabla 5 muestra el rendimiento de biomasa, % de grasa, y producción de DHA para *C. cohnii* cultivado en SSM que contenía cantidades reducidas de NaCl. Puede verse que a medida que la cantidad de NaCl añadida al cultivo disminuye, decrecen tanto la producción de biomasa como los niveles de grasa, dando como resultado una producción menor de DHA.

10

Ejemplo 6

Este ejemplo describe la producción de DHA alcanzada con 4,5 g/l de NaCl en el medio de cultivo descrito en el Ejemplo 1.

- 15 Los cultivos se dejaron crecer como se describe en el Ejemplo 4. La Tabla 6 muestra los resultados de este ejemplo.

Tabla 6. Biomasa, % DHA, % Grasa, y producción de DHA para *C. cohnii* cultivado en SSM del Ejemplo 1

Cloruro de sodio (g/l)	Sulfato de sodio (g/l)	Ion cloruro ¹ (g/l)	Ion sodio (g/l)	% DHA en la grasa (peso/peso)	% grasa en la biomasa (peso/peso)	Biomasa, peso seco (g/l)
4,5 g/l		2,73	1,77	53,9	65,03	3,1

¹ Refleja la cantidad de ion cloruro procedente de cloruro de sodio exclusivamente.

Ejemplo 7

- 20 Este ejemplo describe el crecimiento aumentado de *C. cohnii* y la producción de DHA en medio pobre en cloruro utilizando diversas concentraciones de ion potasio e ion sodio en la forma de sulfato de potasio y sulfato de sodio.

Se preparó SSM pobre en cloruro de la manera descrita en el Ejemplo 3, utilizando 0,18 g/l de acetato de calcio y omitiendo cloruro de calcio y cloruro de potasio. Cada combinación posible de concentraciones de K₂SO₄ de 0,16 g/l, 0,80 g/l, 1,6 g/l, 3,2 g/l, y 4,8 g/l se testaron contra concentraciones de Na₂SO₄ de 4,9 g/l, 9,8 g/l, 14,7 g/l, 19,6 g/l, y 24,5 g/l utilizando una matriz bidimensional. Todos los cultivos se dejaron crecer como se describe en el Ejemplo 4.

- 25 Los resultados se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7. Comparación de la biomasa, % DHA, % grasa, y producción de DHA obtenidos para *C. cohnii* cultivado en medio con concentraciones variables de sulfato de potasio y sulfato de sodio

Matraz	g/l K ₂ SO ₄	g/l Na ₂ SO ₄	Ion sodio ¹ (g/l)	Ion potasio (g/l)	Agua destilada g/l	%DHA en la grasa (peso/peso)	% Grasa en la biomasa (peso/peso)
1	0,16	4,90	1,77	0,07	2,55	57,97	60,80
2	0,16	9,80	3,35	0,07	1,53	52,39	41,45
3	0,16	14,70	4,93	0,07	-	-	-
4	0,16	19,60	6,53	0,07	0,75	42,88	13,28

ES 2 454 196 T3

5	0,16	24,50	8,11	0,07	0,71	41,46	12,11
6	0,80	4,90	1,77	0,36	3,79	56,76	63,19
7	0,80	9,80	3,35	0,36	4,03	55,11	64,96
8	0,80	14,70	4,93	0,36	3,66	55,14	64,39
9	0,80	19,60	6,52	0,36	3,07	56,88	58,12
10	0,80	24,50	8,11	0,36	2,91	57,37	53,65
11	1,60	4,90	1,77	0,72	3,74	55,90	63,46
12	1,60	9,80	3,35	0,72	3,83	55,00	65,43
13	1,60	14,70	4,93	0,72	3,49	56,48	60,09
14	1,60	19,60	6,53	0,72	3,18	54,71	54,92
15	1,60	24,50	8,11	0,72	2,83	54,82	49,02
16	3,20	4,90	1,77	1,44	3,51	54,42	63,99
17	3,20	9,80	3,35	1,44	3,36	55,40	61,12
18	3,20	14,70	4,93	1,44	3,40	55,61	59,34
19	3,20	19,60	6,53	1,44	3,07	57,07	59,44
20	3,20	24,50	8,11	1,44	2,77	57,00	57,07
21	4,80	4,90	1,77	2,15	2,82	54,94	57,43
22	4,80	9,80	3,35	2,15	2,81	53,97	58,12
23	4,80	14,70	4,93	2,15	2,94	54,26	58,75
24	4,80	19,60	6,52	2,15	2,82	55,53	56,88
25	4,80	24,50	8,11	2,15	2,50	57,02	53,00

¹ Incluye ion sodio añadido por 0,45 g/l de cloruro de sodio o 0,18 g/l de ion sodio.

5 Los resultados presentados en la Tabla 7 indican que los niveles incrementados de potasio hacían que el crecimiento y la producción de DHA para *C. cohnii* fuesen comparables al alcanzado para niveles altos de cloruro. El efecto de mejora en este Ejemplo aparecía a 0,8 g/l de sulfato de potasio, el segundo nivel más bajo testado, y después de ello era relativamente insensible a las cantidades de sulfato de potasio. A los niveles más altos de sulfato de potasio testados, 4,8 g/l, parecía producirse una ligera disminución en la producción. El crecimiento y la producción de DHA parecían también relativamente insensibles a la cantidad de sulfato de sodio utilizada; sin embargo, el crecimiento y la producción disminuían ligeramente a medida que se utilizaban cantidades crecientes de sulfato de sodio, comenzando aproximadamente a 19,6 g/l de sulfato de sodio. Las condiciones óptimas basadas en la cantidad de DHA en g/l eran aquéllas que utilizaban: 0,8 g/l K₂SO₄ y 9,8 g/l Na₂SO₄, lo que representaba un aumento de 5 veces en la cantidad de potasio y un aumento de 2 veces en la cantidad de sodio sobre el SSM normal pobre en cloruro (descrito en el Ejemplo 3); y 1,6 g/l K₂SO₄ y 9,8 g/l Na₂SO₄, que representaba un aumento de 10 veces en la cantidad de potasio y un aumento de 2 veces en la cantidad de sodio con respecto al SSM normal pobre en cloruro (descrito en el Ejemplo 3).

15 Ejemplo 8

Este ejemplo demuestra el aumento del crecimiento de *C. cohnii* y la producción de DHA utilizando medios que contenían una gama de sulfato de potasio, 0,32 g/l, 0,64 g/l, 0,96 g/l, 1,28 g/l, 1,60 g/l, y 1,9 g/l y sulfato de sodio a 4,9 g/l y 9,8 g/l.

20 Se preparó SSM pobre en cloruro de la manera descrita en el Ejemplo 7, y todos los cultivos se dejaron crecer como se describe en el Ejemplo 4. Los resultados se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8. Comparación de la biomasa, % DHA, % Grasa, y producción de DHA obtenida para *C. cohnii* cultivado en medio con concentraciones variables de sulfato de potasio y sulfato de sodio

Matraz	g/l K ₂ SO ₄	g/l N ₂ SO ₄	Agua destilada g/l	%DHA en la grasa (peso/peso)	% grasa en la biomasa (peso/peso)	Ion sodio ¹ (g/l)	Ion potasio (g/l)
--------	------------------------------------	------------------------------------	--------------------	------------------------------	-----------------------------------	------------------------------	-------------------

1	0,32	4,90	3,22	57,76	75,22	1,77	0,14
2	0,32	9,80	3,05	57,61	66,15	3,35	0,14
3	0,64	4,90	3,49	58,66	61,45	1,77	0,29
4	0,64	9,80	3,47	58,50	63,22	3,35	0,29
5	0,96	4,90	3,43	58,45	59,98	1,77	0,43
6	0,96	9,80	3,66	51,91	58,03	3,35	0,43
7	1,28	4,90	3,51	58,72	58,67	1,77	0,57
8	1,28	9,80	3,67	56,93	75,09	3,35	0,57
9	1,60	4,90	3,32	57,16	65,76	1,77	0,72
10	1,60	9,80	3,57	56,89	62,11	3,35	0,72
11	1,90	4,90	3,36	56,15	59,95	1,77	0,85
12	1,90	9,80	3,54	54,74	60,42	3,35	0,085

¹ Incluye ion sodio añadido por 0,45 g/l de cloruro de sodio o 0,18 g/l de ion sodio.

- Los resultados que se presentan en la Tabla 8 demostraban que la producción óptima de DHA ocurre con concentraciones de K_2SO_4 a 1,28 g/l y 9,8 g/l de Na_2SO_4 . Los resultados presentados en la Tabla 8 indican que el efecto del potasio adicional puede observarse a niveles de sulfato de potasio tan bajos como 0,32 g/l y que parecen relativamente constantes a partir de 1,90 g/l. El crecimiento y la producción son relativamente insensibles a niveles de sulfato de potasio de 4,9 g/l o 9,8 g/l.

Ejemplo 9

El Ejemplo siguiente describe el subcultivo de *C. cohnii* para obtener una cepa que está adaptada para crecer a pH 5.

- 10 Se cultivó la cepa T-HF de *C. cohnii* en matraces de sacudidas de la manera descrita en el Ejemplo 4, en el medio descrito en el Ejemplo 1, excepto que el pH del medio después del comienzo del cultivo era pH 5. Después de 7 días, se utilizó un inóculo del cultivo para comenzar un cultivo nuevo a pH 5 en las mismas condiciones. Inicialmente, el crecimiento a pH 5 era lento, pero después de transferencias múltiples, la producción de DHA comenzó a aumentar y a lo largo del tiempo se ha aproximado a la producción observada a partir de cultivos desarrollados a pH 6,3, dando como resultado una cepa de pH bajo. Véase la Figura 1. Se observó que el pH del cultivo al final del periodo de crecimiento de 7 días era 5,4. Los intentos para adaptar la cepa utilizando tampones de citrato, malato, acetato, y lactato fueron infructuosos debido a los efectos tóxicos del tampón sobre la cepa T-HF.

La cepa de pH bajo se dejó crecer luego en el medio de pH 5 arriba descrito, pero el pH se mantuvo a 5,0. La cepa adaptada para pH bajo crecía igualmente bien a pH 5 y a pH 5,4.

20

Ejemplo 10

El ejemplo siguiente describe una comparación de las producciones de DHA a partir de la cepa T-HF de *C. cohnii* a pH 6,3 y medio con 2730 ppm de ion cloruro y la cepa de pH bajo a pH 5 en medio con 1000 ppm de ion cloruro.

- 25 La cepa T-HF de *C. cohnii* se cultivó como se describe en el Ejemplo 4 en medio como el descrito en el Ejemplo 1. La cepa *C. cohnii* se dejó crecer en medio pobre en cloruro como se describe en el Ejemplo 2, con adición de sulfato de potasio y sulfato de sodio. Cada experimento se realizó por duplicado, y todos los matraces se recogieron diariamente para determinar la cinética de producción de DHA. Los resultados se muestran en la Figura 1. La Figura 1 muestra que la cinética de producción de DHA era prácticamente idéntica en las condiciones de los dos medios diferentes.

Ejemplo 11

- 30 El ejemplo siguiente describe los esfuerzos para adaptar la cepa T-HF de *C. cohnii* para crecimiento a pH 4,5 en medio con 2730 ppm de ion cloruro.

La cepa T-HF de *C. cohnii* se cultivó de la manera descrita en el Ejemplo 10, con la excepción de que el medio se ajustó a pH 4,5 y la mitad del MSG se reemplazó con lisina, mientras se mantenía un nivel constante de nitrógeno orgánico en el medio.

- 35 Después de cultivo repetido, se obtuvieron rendimientos de DHA de aproximadamente un tercio de los rendimientos observados a pH 5 o pH 6,3.

Ejemplo 12

El ejemplo siguiente describe los esfuerzos para definir las condiciones para crecimiento de *C. cohnii* y las producciones de DHA a pH 4,5 por manipulación de las concentraciones de potasio.

5 A. Se realizaron experimentos factoriales a pH 4,5 para 2,73 g/l de ion cloruro a fin de evaluar el efecto del ion potasio (0,16 g/l a 3,2 g/l). Los resultados demostraron que los niveles más altos de ion potasio aumentaban la producción de DHA aproximadamente hasta dos terceras partes de los rendimientos obtenidos para *C. cohnii* a pH 6,3 con el medio que se describe en el Ejemplo 1.

10 B. Se realizó un experimento factorial de la misma manera descrita en la Parte A, anterior, con la excepción de que los niveles de ion cloruro se mantuvieron constantes en 1,0 g/l. Los resultados demostraron que los niveles más altos de ion potasio aumentaban la producción de DHA hasta aproximadamente dos terceras partes de los rendimientos obtenidos para *C. cohnii* cultivado a pH 6,3 con el medio que se describe en el Ejemplo 1. Las producciones de DHA obtenidas a 2,73 g/l de ion cloruro (descritas en la Parte A, anterior) y a 1,0 g/l de ion cloruro eran comparables.

Ejemplo 13

15 Este ejemplo describe un experimento de evolución temporal que comparaba las producciones de DHA obtenidas utilizando la cepa de pH 4,5 descrita en el Ejemplo 12 y la cepa T-HF a pH 6,3, 1,0 g/l de ion cloruro.

20 La cepa de pH 4,5 del Ejemplo 12 se cultivó en medio de pH 4,5 pobre en cloruro, como se especifica en la Tabla 9 en matraces de sacudidas según la manera descrita en el Ejemplo 4. La cepa T-HF de *C. cohnii* se cultivó de la manera descrita en el Ejemplo 4 utilizando el medio descrito en el Ejemplo 1. El inóculo para el experimento de pH 4,5 se preparó a pH 4,5, y las cantidades de inóculo se estimaron debido a la aglutinación de las células a pH 4,5.

Tabla 9. Medio de pH 4,5 pobre en cloruro.

Compuesto	Concentración Final	Cantidad de ion cloruro añadida (g/l)	Cantidad de ion potasio añadida (g/l)	Cantidad de ion sodio añadida (g/l)
CaCl ₂ -2H ₂ O	0,3 g/l	0,09		
MgSO ₄ -7H ₂ O	1,25 g/l			
NaCl	1,41	0,86		0,55
MES	10,7 g/l			
MSG	0,75 g/l			
Tastone 154	0,5 g/l			
Lisina-HCl	0,37			
KH ₂ PO ₄	0,014 g/l		0,004	
K ₂ SO ₄	0,15		0,07	
Na ₂ SO ₄	3,46			1,12
CuSO ₄ -5H ₂ O	0,15 X 10 ⁻³ g/l			
H ₃ BO ₃	10 X 10 ⁻³ g/l			
MnCl ₂ -4H ₂ O	4,5 X 10 ⁻³ g/l	insignificante		
ZnSO ₄ -7H ₂ O	0,3 X 10 ⁻³ g/l			
NaOH (para ajustar el pH a 6,3)	1,16 g/l			0,67
FeCl ₂ ¹	6 X 10 ⁻³ g/l	insignificante		
Tiamina ²	1 X 10 ⁻³ g/l			
Biotina ²	2 X 10 ⁻⁶ g/l			
Glucosa ³	50 g/l			
Total de cada ion		0,30	0,08	0,74

5 Los matraces se cosecharon diariamente para determinar la cinética de la producción de DHA. Los resultados del experimento (Figura 2) indicaban que la producción de DHA a pH 4,5 era siempre menor que a pH 6,3, pero que la tasa de aumento en la producción de DHA en función del tiempo era aproximadamente la misma para cada valor de pH. Esto sugiere que a pH 4,5 el cultivo es capaz de acumular DHA a la misma tasa que el cultivo a pH 6,3; sin embargo, existía un retraso en la producción de DHA en los cultivos dejados crecer a pH 4,5 comparada con pH 6,3.

10 Este resultado demuestra que dado un tiempo extra, a saber aproximadamente 24 horas, la producción de DHA a pH 4,5 era igual que a pH 6,3. No estaba claro si el retardo estaba causado por una demora en la acumulación de DHA a pH 4,5, y como resultado, el cultivo a pH 4,5 tenía siempre un producción de DHA que era menor que el cultivo de pH 6,3 de la misma edad, o si el retardo estaba causado porque el cultivo de pH 4,5 no recibía una cantidad equivalente de inóculo. A pH 4,5 las células de la cepa T-HF se aglomeran de tal modo que no es posible obtener un recuento exacto de células del cultivo, y la cantidad de inóculo a utilizar tiene que estimarse. Por tanto, es posible que el cultivo de pH 4,5 recibiera menos inóculo y por esta razón causara un retardo aparente en la cinética de producción de DHA.

15 Sin embargo, estos datos indicaban que utilizando la cepa de *C. cohnii* adaptada a pH bajo y el medio de cultivo presente a pH 4,5 puede alcanzarse el mismo producción de DHA que con el medio de cultivo a pH 6,3, si se prolonga el tiempo de cultivo.

Ejemplo 14

20 Una optimización adicional de las concentraciones iónicas descritas en el Ejemplo 13 anterior y el subcultivo ulterior de la cepa T-HF de *C. cohnii* que ha sido adaptada a pH 5, utilizando técnicas descritas en el Ejemplo 10, se llevan a cabo para reducir el tiempo de retardo, dando como resultado rendimientos de DHA en 7 días a pH 4,5 que son comparables a los rendimientos obtenidos para *C. cohnii* cultivado a pH 6,3 con el medio que se describe en el Ejemplo 1.

25 Los principios, realizaciones preferidas y modos de operación de la presente invención se han descrito en la memoria descriptiva que antecede. La invención que se propone proteger en esta memoria no debe interpretarse, sin embargo, limitada a las formas particulares descritas, dado que estas deben considerarse como ilustrativas más bien que restrictivas.

REIVINDICACIONES

1. Un método de producción de ácido docosahexaenoico (DHA) por cultivo de microalgas heterótrofas de la clase Dinofíceas en un medio de cultivo, en donde el medio comprende:
 - (a) ión cloruro a una concentración menor que o igual a aproximadamente 2 g/l; y
 - (b) ión potasio a una concentración mayor que o igual a aproximadamente 0,25 g/l;
- 5 en donde la microalga produce al menos aproximadamente 0,04 g DHA por 10^9 células.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el medio comprende además:
 - (c) ion sodio en una ratio menor que o igual a aproximadamente 27:1 peso:peso sodio:potasio.
3. El método de la reivindicación 2, en donde la ratio sodio:potasio es menor que o igual a aproximadamente
- 10 15:1 peso:peso.
4. El método de la reivindicación 2, en donde la concentración de ion potasio es aproximadamente 0,8 g/l y la ratio sodio:potasio es aproximadamente 4:1 peso:peso.
5. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde la microalga es del género *Crypthecodinium*.
6. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde la microalga es de la especie *Crypthecodinium*
- 15 *cohnii*.
7. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde la concentración del ion cloruro es menor que o igual a aproximadamente 1,0 g/l.
8. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde la concentración del ion cloruro es menor que o igual a aproximadamente 0,3 g/l.
- 20 9. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde la concentración del ion potasio es mayor que o igual a aproximadamente 0,4 g/l.
10. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde la concentración del ion potasio es mayor que o igual a aproximadamente 0,8 g/l.
11. El método de la reivindicación anterior, en donde una fuente del ion potasio es sulfato de potasio.
- 25 12. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde el medio comprende adicionalmente ion sodio a una concentración que va desde aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 8 g/l.
13. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde la concentración del ion sodio es de aproximadamente 1,5 g/l a aproximadamente 5 g/l.
14. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde una fuente de ion sodio es sulfato de sodio.
- 30 15. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde la concentración del ion potasio es aproximadamente 0,8 g/l y la concentración del ion sodio es aproximadamente 3,2 g/l.
16. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde las microalgas producen al menos aproximadamente 0,10 g DHA por 10^9 células.
- 35 17. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde las microalgas producen al menos aproximadamente 0,20 g DHA por 10^9 células.
18. El método de cualquier reivindicación anterior, que comprende adicionalmente recuperar de las microalgas un lípido que contiene DHA

Producción de DHA de la Cepa T en SSM de pH 6,3 frente a LCSSI de pH 5,0

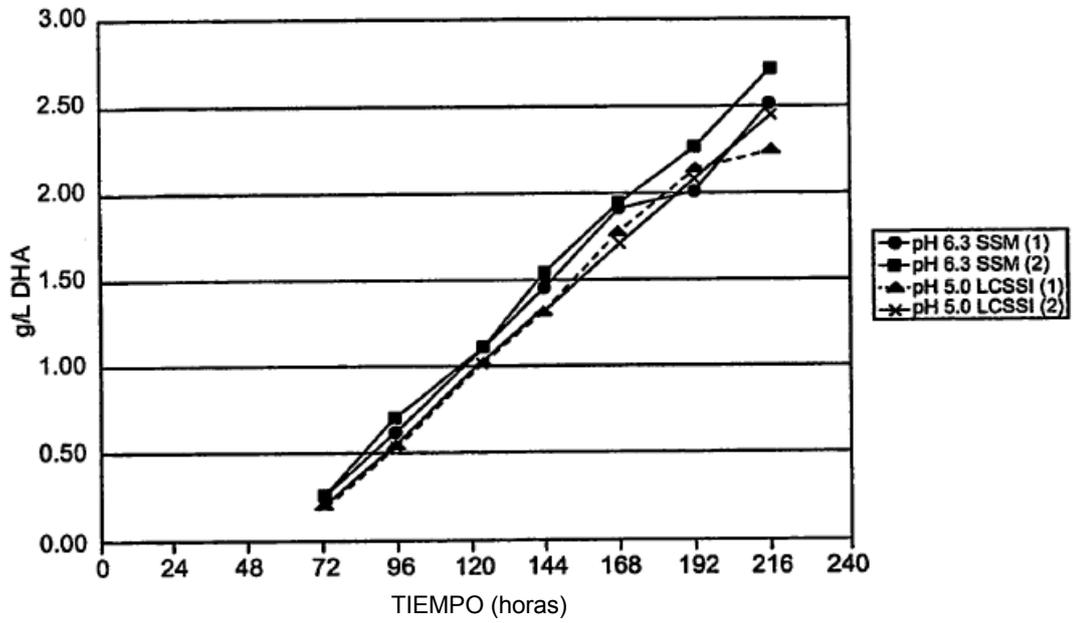


Fig. 1

Producción de DHA de la Cepa T en SSM de pH 6,3 frente a LCSSI de pH 4,5

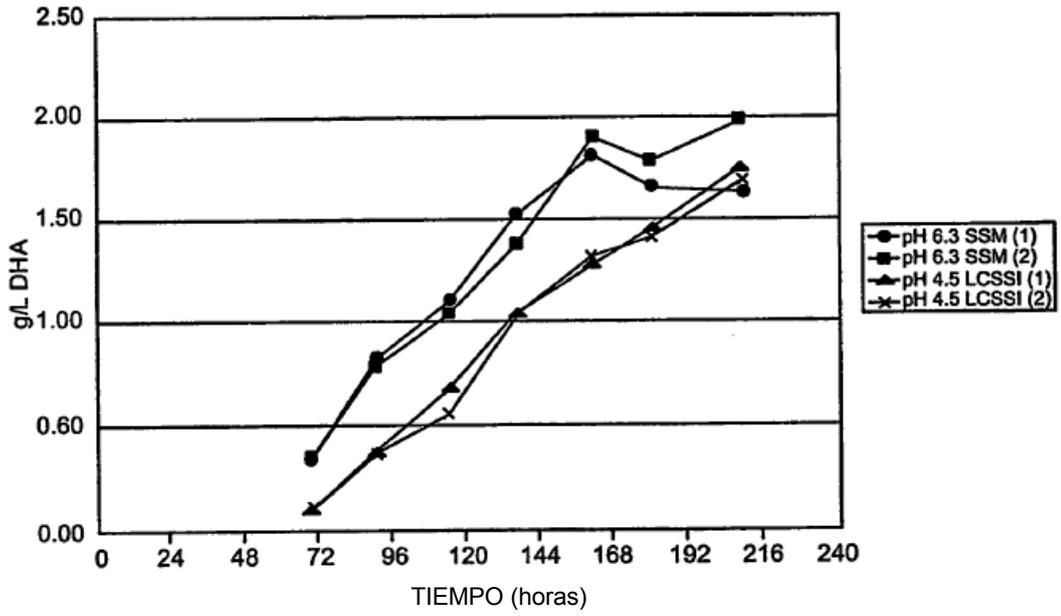


Fig. 2