(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 654 384**

(51) Int. CI.:

C12N 1/00 (2006.01)
A23D 9/00 (2006.01)
C12P 7/64 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.01.2001 E 10012185 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.09.2017 EP 2341125**

(54) Título: **Producción mejorada de lípidos que contienen ácidos grasos polienoicos por cultivos de alta densidad de microbios eucariotas en fermentadores**

(30) Prioridad:

28.01.2000 US 178588 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.02.2018

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

BAILEY, RICHARD B.;
DIMASI, DON;
HANSEN, JON M.;
MIRRASOUL, PETER J.;
RUECKER, CRAIG M.;
VEEDER, GEORGE T. III;
KANEKO, TATSUO y
BARCLAY, WILLIAM R.

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones :

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

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

DESCRIPCIÓN

Producción mejorada de lípidos que contienen ácidos grasos polienoicos por cultivos de alta densidad de microbios eucariotas en fermentadores.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a fermentar o cultivar microorganismos del orden Thraustochytriales en un medio de cultivo con un nivel de oxígeno disuelto menor que 5% de saturación. En particular, la presente invención se refiere a producir lípidos poliinsaturados microbianos.

Antecedentes de la invención

Se ha creído en general que la producción de ácidos grasos polienoicos (ácidos grasos que contienen 2 o más enlaces carbono-carbono insaturados) en microorganismos eucariotas requiere la presencia de oxígeno molecular (es decir, condiciones aerobias). Esto es debido a que se cree que el doble enlace cis formado en los ácidos grasos de todos los microorganismos eucariotas no parasitarios implica una reacción de desaturación dependiente de oxígeno, directa, (sistemas de desaturasa microbiana oxidativa). Otros lípidos microbianos eucariotas que se sabe que requieren oxígeno molecular incluyen esteroles fúngicos y vegetales, oxicarotenoides (es decir, xantofilas), ubiquinonas y compuestos preparados a partir de cualquiera de estos lípidos (es decir, metabolitos secundarios).

Se ha demostrado que algunos microbios eucariotas (tales como algas; hongos, incluyendo levaduras y protistas) son buenos productores de ácidos grasos polienoicos en fermentadores. Sin embargo, el cultivo de muy alta densidad (mayor que aproximadamente 100 g/l de biomasa microbiana, especialmente a escala comercial) puede conducir a contenidos disminuidos en ácidos grasos polienoicos y por lo tanto productividad disminuida de ácidos grasos polienoicos. Esto puede ser debido en parte a diversos factores incluyendo la dificultad de mantener altos niveles de oxígeno disuelto debido a la alta demanda de oxígeno desarrollada por la alta concentración de microbios en el caldo de fermentación. Los métodos para mantener mayor nivel de oxígeno disuelto incluyen aumentar la velocidad de aireación y/o usar oxígeno puro en vez de aire para aireación y/o aumentar la velocidad con que se remueve en el fermentador. Estas soluciones generalmente aumentan el coste de la producción de lípidos y el coste de capital del equipo de fermentación y pueden producir problemas adicionales. Por ejemplo, la aireación aumentada puede conducir fácilmente a graves problemas de formación de espuma en el fermentador a altas densidades de células y el mezclamiento aumentado puede conducir a ruptura celular microbiana debido a fuerzas de cizallamiento aumentadas en el caldo de fermentación (esto produce que los lípidos se liberen en el caldo de fermentación donde pueden llegar a oxidarse y/o degradarse mediante enzimas). La ruptura celular microbiana es un problema aumentado en las células que han experimentado limitación o agotamiento de nitrógeno para inducir la formación de lípidos, dando como resultado paredes celulares más débiles.

Como resultado, cuando se cultivan microbios eucariotas productores de lípidos a concentraciones celulares muy altas, sus lípidos contienen en general sólo cantidades muy pequeñas de ácidos grasos polienoicos. Por ejemplo, la levadura *Lipomyces starkeyi* se ha cultivado a una densidad de 153 g/l con concentración de lípidos resultantes de 83 g/l en 140 horas usando alcohol como fuente de carbono. Sin embargo, el contenido en ácidos grasos polienoicos de la levadura a una concentración mayor que 100 g/l dio como promedio sólo 4,2% de ácidos grasos totales (bajando desde una alta de 11,5% de ácido graso total a una densidad celular de 20-30 g/l). Yamauchi *et al., J. Ferment. Technol,* 1.983, *61,* 275-280. Esto da como resultado una concentración de ácidos grasos polienoicos de sólo aproximadamente 3,5 g/l y una productividad de ácidos grasos polienoicos promedio de sólo aproximadamente 0,025 g/l/h. Adicionalmente, el único ácido graso polienoico indicado en los lípidos de levaduras fue C18:2.

Se ha demostrado que otra levadura, *Rhodotorula glutinus,* presenta una productividad de lípidos promedio de aproximadamente 0,49 g/l/h, pero también un contenido en ácidos grasos polienoicos total bajo en sus lípidos (15,8% de ácidos grasos totales, 14,7% de C18:2 y 1,2% de C18:3) dando como resultado una productividad de ácidos grasos polienoicos en un cultivo discontinuo alimentado de sólo aproximadamente 0,047 g/l/h y 0,077 g/l/h en cultivo continuo.

Uno de los presentes autores ha demostrado previamente que algunas microalgas marinas en el orden Thraustochytriales pueden ser excelentes productores de ácidos grasos polienoicos en fermentadores, especialmente cuando se cultivan a niveles de baja salinidad y especialmente a niveles de cloruro muy bajos. Otros han descrito que Thraustochytrids presenta una productividad de ácidos grasos polienoicos promedio (DHA, C22: 6n-3 y DPA, C22:5n-6) de aproximadamente 0,158 g/l/h, cuando se cultiva a densidad celular de 59 g/l en 120 horas. Sin embargo, esta productividad sólo se consiguió a una salinidad de aproximadamente 50% de agua de mar, una concentración que produciría una seria corrosión en fermentadores de acero inoxidable convencionales.

Beach et al, Biochimica et Biophysica Acta, vol. 316, N°1, 1 enero 1973, paginas 56-65, describe un pocedeimiento para producir lípidos con *Crypthecodinium Cohnii*.

La patente internacional WO 98/03671 describe un procedimiento para preparar lípidos que contienen ácido docosahexaenoico (DHA) y/o ácido docosapentaenoico (DPA) (ambos por sus siglas en inglés) cultivando microorganismos y un microorganismo pertenece al género Ulkenia con la capacidad para producir los lípidos.

Lena Hansson *et al.,* Appl. Microbiol Biotechnol (1986) 24 : 187 - 192 describen formación de lípidos por la levadura *Cryptococcus albidus* en cultivos de quimiostatos limitados en nitrógeno y en limitados en carbono.

Lena Hansson *et al.*, Appl. Microbiol Biotechnol (1986) 24 : 12-18 describe la influencia de las condiciones de cultivo sobre la producción de lípidos por la levadura *Cryptococcus albidus.*

El documento WO94/08467 da a conocer un proceso para cultivar la microflora *Thraustochytrium, Schizochytrium* y mezclas de las mismas, que incluye el cultivo de la microflora en un medio de fermentación que contiene sales sódicas que no contienen cloruro.

Los costes de producción de lípidos microbianos que contienen ácidos grasos polienoicos y especialmente los ácidos grasos altamente insaturados, tales como C18:4n-3, C20:4n-6, C20:5n3, C22:5n-3, C22:5n-6 y C22:6n-3, han permanecido altos en parte debido a las densidades limitadas a las que se han cultivado los microbios eucariotas que contienen alto contenido en ácidos grasos polienoicos y la disponibilidad limitada de oxígeno ambas a estas altas concentraciones celulares y las mayores temperaturas necesarias para conseguir alta productividad.

Por lo tanto, hay una necesidad de un procedimiento para cultivar microorganismos a alta concentración que facilite aún la producción aumentada de lípidos conteniendo ácidos grasos polienoicos.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un método para enriquecer el contenido en ácidos grasos polienoicos de un microorganismo del orden Thraustochytriales que comprende fermentar dicho microorganismo en un medio de cultivo con un nivel de oxígeno disuelto menor que 5%.

La presente invención proporciona además un procedimiento heterotrófico para producir productos y microorganismos del orden Thraustochytriales que comprende:

a. cultivar dichos microorganismos en un medio de cultivo en el que dichos microorganismos contienen genes de policétido sintasa; y

b. mantener el nivel de oxígeno disuelto a menos de aproximadamente 5%.

Las realizaciones proporcionan un procedimiento para cultivar microorganismos eucariotas del orden Thraustochytriales que son capaces de producir al menos aproximadamente 20% de su biomasa como lípidos y un método para producir los lípidos. Los lípidos contienen uno o más ácidos grasos polienoicos. Una realización del procedimiento comprende añadir a un medio de fermentación que comprende microorganismos eucariotas del orden Thraustochytriales una fuente de carbono, preferiblemente una fuente de carbono no alcohol y una fuente de nutriente limitante. Preferiblemente, la fuente de carbono y la fuente de nutriente limitante se añaden a una velocidad suficiente para aumentar la densidad de biomasa del medio de fermentación a al menos aproximadamente 100 g/l.

La condición de fermentación puede comprender una fase de aumento de la densidad de biomasa y una fase de producción de lípidos, en la que la fase de aumento de la densidad de biomasa puede comprender añadir la fuente de carbono y la fuente de nutriente limitante y la fase de producción de lípidos comprende añadir la fuente de carbono sin añadir la fuente de nutriente limitante para crear las condiciones que induzcan la producción de lípidos.

En una realización de la presente invención, la cantidad de oxígeno disuelto presente en el medio de fermentación durante la fase de producción de lípidos es menor que la cantidad de oxígeno disuelto presente en el medio de fermentación durante la fase de aumento de la densidad de biomasa.

En una realización, se cultivan microorganismos en un procedimiento alimentado discontinuo.

En una realización, la presente invención proporciona mantener un nivel de oxígeno menor que aproximadamente 3% de saturación en el medio de fermentación durante la segunda mitad del procedimiento de fermentación.

Se describe también un procedimiento para producir lípidos microbianos eucariotas que comprende:

(a) cultivar microorganismos eucariotas en un medio de fermentación para aumentar la densidad de biomasa de dicho medio de fermentación a al menos aproximadamente 100 g/l;

(b) proporcionar condiciones de fermentación suficientes para permitir que dichos microorganismos produzcan dichos lípidos y

(c) recuperar dichos lípidos,

en los que más del aproximadamente 15% de dichos lípidos son lípidos poliinsaturados.

Otra realización proporciona un procedimiento de recuperación de lípidos que comprende:

(d) retirar agua de dicho medio de fermentación para proporcionar microorganismos secos y

(e) aislar dichos lípidos de dichos microorganismos secos.

Preferiblemente, la etapa de eliminación de agua comprende poner en contacto el medio de fermentación directamente en un secador de tambor sin centrifugación previa.

Otro aspecto proporciona un procedimiento de recuperación de lípidos que comprende:

(d) tratar en caldo de fermentación para permeabilizar, lisar o romper las células microbianas y

(e) recuperar los lípidos del caldo de fermentación por separación por gravedad y preferiblemente centrifugación, con o sin la ayuda de un disolvente soluble en agua para ayudar a la ruptura de la emulsión lípido/agua.

Preferiblemente, las células microbianas se tratan en la etapa (c) en un fermentador o un recipiente similar.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una tabla y una representación gráfica de diversos parámetros de producción de lípidos de un microorganismo frente a la cantidad de oxígeno disuelto en un medio de fermentación.

Descripción detallada de la invención

El procedimiento de la presente invención se puede usar para producir lípidos altamente insaturados (es decir, lípidos que contienen 4 o más enlaces carbono-carbono insaturados) tales como ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y/u omega-6, incluyendo ácido docosahexaenoico (es decir, DHA) y otros compuestos insaturados, poliinsaturados y altamente insaturados que se encuentran en la naturaleza. Como se usa en la presente memoria, el término "lípido" incluye fosfolípidos; ácidos grasos libres; ésteres de ácidos grasos; triacilgliceroles; esteroles y ésteres de esterol; carotenoides; xantofilas (por ej., oxicarotenoides); hidrocarburos; compuestos derivados de isoprenoides y otros lípidos conocidos para un experto en la materia.

Específicamente, los procedimientos de la presente invención son útiles en el cultivo de microorganismos del orden Thraustochytriales que producen ácido o ácidos grasos polienoicos y para producir ácido o ácidos grasos polienoicos microbianos.

Aunque los procedimientos de la presente invención se pueden usar para cultivar una amplia variedad de microorganismos del orden Thraustochytriales y para obtener compuestos que contengan lípidos poliinsaturados producidos por los mismos, por brevedad, conveniencia e ilustración, esta descripción detallada de la invención discutirá procedimientos para cultivar microorganismos del orden Thraustochytriales que sean capaces de producir lípidos comprendiendo ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y/u omega-6, en particular microorganismos que sean capaces de producir DHA (o compuestos estrechamente relacionados tales como DPA, EPA o ARA).

Más en particular, se discutirán realizaciones preferidas de la presente invención con referencia a un procedimiento para cultivar microorganismos marinos del orden Thraustochytriales, más específicamente Thraustochytriales del género *Thraustochytrium* y *Schizochytrium,* incluyendo Thraustochytriales que se describen en las Patentes de EE.UU. cedidas comúnmente Nº 5.340.594 y 5.340.742, ambas expedidas a Barclay. Se debería observar que muchos expertos están de acuerdo con que *Ulkenia* no es un género separado, sino que es de hecho parte del género *Schizochytrium.* Como se usa en la presente memoria, el género *Schizochytrium* incluirá *Ulkenia.*

Los microorganismos preferidos son aquéllos que producen los compuestos de interés por sistemas de la policétido sintasa. Dichos microorganismos incluyen microorganismos que tienen un sistema de policétido sintasa endógeno y microorganismos en los que se ha logrado genéticamente un sistema de policétido sintasa. Los policétidos son productos naturales estructuralmente diversos que presentan un amplio intervalo de actividades biológicas, incluyendo propiedades antibióticas y farmacológicas. La biosíntesis de la cadena principal de la cadena carbonada de los policétidos es catalizada por policétido sintasas. Como las sintasas de ácidos grasos relacionadas estructuralmente y mecanísticamente, las policétido sintasas catalizan las condensaciones descarboxilativas repetidas entre tioésteres acílicos que extienden la cadena carbonada dos carbonos cada vez. Sin embargo, a diferencia de las sintasas de ácido graso, las policétido sintasas pueden generar gran variabilidad estructural en el producto final. Los sistemas de la policétido sintasa individuales pueden hacer esto usando unidades de partida distintas de acetato, utilizando malonato de metilo o etilo como la unidad extendedora y variando el ciclo reductor de cetorreducción, deshidratación y reducción de enoílo sobre el grupo beta-ceto formado después de cada condensación. Es de particular interés aquí que los dobles enlaces carbono-carbono que se introducen por la etapa de deshidratación se puedan mantener en el producto final. Además, aunque estos dobles enlaces están inicialmente en la configuración trans, se pueden convertir en la configuración cis encontrada en DHA (y otros ácidos grasos polienoicos de interés) por isomerización enzimática. Ambas reacciones de deshidrasa y de isomerización pueden tener lugar en ausencia de oxígeno molecular.

Según la presente invención se proporciona un procedimiento heterotrófico para producir productos y

microorganismos del orden Thraustochytriales. El procedimiento comprende pcultivar los microorganismos en un medio de cultivo en el que los microorganismos contienen un sistema de policétido sintasa. El nivel de oxígeno disuelto se mantiene a menos de aproximadamente 5 por ciento, más preferiblemente a menos de aproximadamente 4 por ciento, más preferiblemente a menos de aproximadamente 3 por ciento y más preferiblemente a menos de aproximadamente 1 por ciento.

Asumiendo un régimen de producción relativamente constante de lípidos por un alga, es fácilmente evidente que la mayor densidad de biomasa conducirá a una cantidad total mayor de lípidos producidos por volumen. Los procedimientos de fermentación convencionales actuales para cultivar algas proporcionan una densidad de biomasa de desde aproximadamente 50 a aproximadamente 80 g/l o menos. Los presentes autores han encontrado que usando los procedimientos de la presente invención, se puede conseguir una densidad de biomasa significativamente mayor que la densidad de biomasa conocida en la actualidad. Preferiblemente, los procedimientos de la presente invención producen densidad de biomasa de al menos aproximadamente 100 g/l, más preferiblemente al menos aproximadamente 130 g/l, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 150 g/l, incluso más preferiblemente aún al menos aproximadamente 170 g/l y lo más preferiblemente mayor que 200 g/l. Así, con dicha densidad de biomasa alta, incluso si el régimen de producción de lípidos del alga disminuye ligeramente, el régimen de producción de lípidos total por volumen es significativamente mayor que en los procedimientos conocidos en la actualidad.

Los procedimientos de la presente invención para cultivar microorganismos del orden Thraustochytriales pueden incluir añadir una fuente de carbono y una fuente de un nutriente limitante a un medio de fermentación que comprende los microorganismos a una velocidad suficiente para aumentar la densidad de biomasa del medio de fermentación a los descritos anteriormente. Como se usa en la presente memoria, el término "fuente de nutriente limitante" se refiere a una fuente de un nutriente (incluyendo el propio nutriente) esencial para el crecimiento de un microorganismo por que, cuando se agota el nutriente limitante del medio de cultivo, su ausencia limita sustancialmente el crecimiento o la replicación del microorganismo, adicional. Sin embargo, puesto que los otros nutrientes aún se encuentran en abundancia, el organismo puede continuar fabricando y acumulando productos intracelulares y/o extracelulares. Eligiendo un nutriente limitante específico, se puede controlar el tipo de productos que se acumulan. Por lo tanto, proporcionar una fuente de nutriente limitante a una cierta velocidad permite que se controlen tanto la velocidad de crecimiento del microorganismo como la producción o acumulación de productos deseados (por ejemplo, lípidos). Este procedimiento de fermentación, donde se añade uno o más sustratos (por ejemplo, una fuente de carbono y una fuente de nutriente limitante) en incrementos, se refiere en general como un procedimiento de fermentación alimentado discontinuo. Se ha encontrado que cuando se añade el sustrato a un procedimiento de fermentación discontinuo la gran cantidad de fuente de carbono presente (por ejemplo, aproximadamente 200 g/l o más por 60 g/l de densidad de biomasa) presentó un efecto perjudicial sobre los microorganismos. Sin estar limitados por ninguna teoría, se cree que dicha alta cantidad de fuente de carbono produce efectos perjudiciales, incluyendo estrés osmótico, para los microorganismos e inhibe la productividad inicial de los microorganismos. Los procedimientos de la presente invención evitan este efecto perjudicial no deseado al tiempo que se proporciona una cantidad suficiente del sustrato para conseguir la densidad de biomasa descrita anteriormente de los microorganismos.

Los procedimientos de la presente invención para cultivar microorganismos pueden incluir una fase de aumento de la densidad de biomasa. En la fase de aumento de densidad de biomasa, el objetivo principal del procedimiento de fermentación es aumentar la densidad de biomasa en el medio de fermentación para obtener la densidad de biomasa descrita anteriormente. La velocidad de adición de fuente de carbono se mantiene típicamente a un nivel o intervalo particular que no produzca un efecto perjudicial significativo sobre la productividad de los microorganismos o la viabilidad de los microorganismos que resulten de capacidades insuficientes del equipo de fermentación para retirar calor de, y transferir gases a y desde, el caldo líquido. Un intervalo apropiado de la cantidad de fuente de carbono necesaria para un microorganismo particular durante un procedimiento de fermentación es conocido para un experto en la materia. Preferiblemente, una fuente de carbono de la presente invención es una fuente de carbono no alcohólica, es decir, una fuente de carbono que no contiene alcohol. Como se usa en la presente memoria, un "alcohol" se refiere a un compuesto que tiene 4 o menos átomos de carbono con un grupo hidroxi, por ejemplo, metanol, etanol e isopropanol pero para el propósito de esta invención no incluye hidroxiácidos orgánicos tales como ácido láctico y compuestos similares. Más preferiblemente, una fuente de carbono es un carbohidrato, incluyendo, pero no limitado a, fructosa, glucosa, sacarosa, melazas y almidón. Otras fuentes de carbono y fuentes de nitrógeno, simples y complejas, adecuadas, se describen en las patentes referidas anteriormente. Típicamente, sin embargo, se usa un carbohidrato, preferiblemente jarabe de maíz, como la fuente de carbono principal. Los ácidos grasos, en la forma de hidroxiácidos grasos, triglicéridos y di- y monoglicéridos también pueden servir como fuente de carbono.

Son fuentes de nitrógeno preferidas en particular: urea, nitrato, nitrito, proteína de soja, aminoácidos, proteína, agua empleada para remojar el maíz, extracto de levadura, subproductos animales, sal amónica inorgánica, más preferiblemente sales de amonio de sulfato, hidróxido y lo más preferiblemente hidróxido de amonio. Otras fuentes de nutrientes limitantes incluyen fuentes de carbono (como se definió anteriormente), fuentes de fosfato, fuentes de vitaminas (tales como fuentes de vitamina B_{12}, fuentes de pantotenato, fuentes de tiamina) y fuentes de metales traza (tales como fuentes de cinc, fuentes de cobre, fuentes de cobalto, fuentes de níquel, fuentes de hierro, fuentes de manganeso, fuentes de molibdeno) y fuentes de metales principales (tales como fuentes de magnesio, fuentes de

calcio, fuentes de sodio, fuentes de potasio y fuentes de sílice, etc.). Fuentes de metales traza y fuentes de metales principales pueden incluir sales de sulfato y cloruro de estos metales (por ejemplo, pero no limitado a, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; $NiSO_4 \cdot 6\ H_2O$; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; $CaCl_2$; K_2SO_4; KCl y Na_2SO_4).

Cuando se usa amonio como fuente de nitrógeno, el medio de fermentación se hace ácido si no se controla por adición de base o tampones. Cuando se usa hidróxido de amonio como la fuente de nitrógeno principal, también se puede usar para proporcionar un control del pH. Los microorganismos del orden Thraustochytriales, en particular Thraustochytriales del género *Thraustochytrium y Schizochytrium,* se cultivarán por un amplio intervalo de pH, por ejemplo de aproximadamente pH 5 a aproximadamente pH 11. Un intervalo de pH apropiado para fermentación de un microorganismo particular está dentro del conocimiento de un experto en la materia.

Los procedimientos de la presente invención para cultivar microorganismos también pueden incluir una fase de producción. En esta fase, el uso principal del sustrato por los microorganismos no es aumentar la densidad de biomasa sino más bien usar el sustrato para producir lípidos. Se debería apreciar que los lípidos también son producidos por los microorganismos durante la fase de aumento de la densidad de biomasa; sin embargo, como se indicó anteriormente, el objetivo principal en la fase de aumento de la densidad de biomasa es aumentar la densidad de biomasa. Típicamente, durante la fase de producción se reduce o preferiblemente se detiene la adición del sustrato nutriente limitante.

Previamente se creía en general que la presencia de oxígeno disuelto (OD) en el medio de fermentación es crucial en la producción de compuestos poliinsaturados, incluyendo ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y/u omega-6, por microorganismos eucariotas. Así, se creía en general que era preferida una cantidad relativamente grande de oxígeno disuelto en el medio de fermentación. Sorprendentemente e inesperadamente, sin embargo, los presentes autores han encontrado que el régimen de producción de lípidos aumenta espectacularmente cuando se reduce el nivel de oxígeno disuelto durante la fase de producción. Así, aunque el nivel de oxígeno disuelto en el medio de fermentación durante la fase de aumento de la densidad de biomasa es preferiblemente al menos aproximadamente 8% de la saturación y preferiblemente al menos aproximadamente 4% de la saturación, durante la fase de producción el oxígeno disuelto en el medio de fermentación se reduce a aproximadamente 3% de la saturación o menos, preferiblemente aproximadamente 1% de la saturación o menos y más preferiblemente aproximadamente 0% de saturación. Al comienzo de la fermentación el OD puede estar en, o cerca de, la saturación y a medida que crecen los microbios se permite la desviación hasta estos valores de ajuste de OD bajos. En una realización particular de la presente invención, la cantidad de nivel de oxígeno disuelto en el medio de fermentación varía durante el procedimiento de fermentación. Por ejemplo, para un procedimiento de fermentación con tiempo de fermentación total de desde aproximadamente 90 horas a aproximadamente 100 horas, el nivel de oxígeno disuelto en el medio de fermentación se mantiene a aproximadamente 8% durante las primeras 24 horas, aproximadamente 4% desde la aproximadamente 24ª hora a aproximadamente 40ª hora y aproximadamente 0,5% o menos de la aproximadamente 40ª hora al final del procedimiento de fermentación.

La cantidad de oxígeno disuelto presente en el medio de fermentación se puede controlar controlando la cantidad de oxígeno en la cámara de aire del fermentador o preferiblemente controlando la velocidad a la que se remueve (o se agita) el medio de fermentación. Por ejemplo, una velocidad a la que se remueve (o agita) alta da como resultado una cantidad relativamente mayor de oxígeno disuelto en el medio de fermentación que una velocidad a la que se remueve baja. Por ejemplo, en un fermentador de aproximadamente 52.996 litros (14.000 galones) de capacidad la velocidad a la que se remueve se fija a de aproximadamente 5 rad/s (50 rpm) a aproximadamente 7 rad/s (70 rpm) durante las primeras 12 horas, de aproximadamente 6 rad/s (55 rpm) a aproximadamente 8 rad/s (80 rpm) durante aproximadamente la 12ª hora a aproximadamente 18ª hora y de aproximadamente 7 rad/s (70 rpm) a aproximadamente 9 rad/s (90 rpm) de aproximadamente la 18ª hora al final del procedimiento de fermentación para conseguir el nivel de oxígeno disuelto discutido anteriormente para un tiempo del procedimiento de fermentación total de desde aproximadamente 90 horas a aproximadamente 100 horas. Un intervalo particular de velocidades a las que se remueve necesarias para conseguir una cantidad particular de oxígeno disuelto en el medio de fermentación se puede determinar fácilmente por un experto en la materia.

Una temperatura preferida para los procedimientos de la presente invención es al menos aproximadamente 20°C, más preferiblemente al menos aproximadamente 25°C y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 30°C. Se debería apreciar que el agua fría puede retener una cantidad mayor de oxígeno disuelto que el agua caliente. Así, una temperatura mayor del medio de fermentación presenta el beneficio adicional de reducir la cantidad de oxígeno disuelto, que se desea en particular como se describió anteriormente.

Algunos microorganismos pueden requerir una cierta cantidad de minerales salinos en el medio de fermentación. Estos minerales salinos, especialmente iones cloruro, pueden producir corrosión del fermentador y otro equipo de tratamiento aguas abajo. Para prevenir o reducir estos efectos no deseados debido a una cantidad relativamente grande de iones cloruro presentes en el medio de fermentación, los procedimientos de la presente invención también pueden incluir usar sales de sodio que no contienen cloruro, preferiblemente sulfato de sodio, en el medio de fermentación como fuente de sodio. Más en particular, una porción significativa de los requerimientos de sodio de la fermentación es suministrada como sales de sodio que no contienen cloruro. Por ejemplo, menos de aproximadamente 75% del sodio en el medio de fermentación es suministrado como cloruro de sodio, más

preferiblemente menos de aproximadamente 50% y más preferiblemente menos de aproximadamente 25%. Los microorganismos de la presente invención se pueden cultivar a concentraciones de cloruro de menor que aproximadamente 3 g/l, más preferiblemente menor que aproximadamente 500 mg/l, más preferiblemente menor que aproximadamente 250 mg/l y más preferiblemente entre aproximadamente 60 mg/l y aproximadamente 120 mg/l.

Las sales de sodio que no contienen cloruro pueden incluir sosa (una mezcla de carbonato de sodio y óxido de sodio), carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, sulfato de sodio y mezclas de los mismos y preferiblemente incluyen sulfato de sodio. Sosa, carbonato de sodio y bicarbonato de sodio tienden a aumentar el pH del medio de fermentación, requiriéndose así etapas de control para mantener el pH apropiado del medio. La concentración de sulfato de sodio es eficaz para satisfacer los requerimientos de salinidad de los microorganismos, preferiblemente la concentración de sodio es (expresada como g/l de Na) al menos aproximadamente 1 g/l, más preferiblemente en el intervalo de desde aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 50 g/l y más preferiblemente en el intervalo de desde aproximadamente 2 g/l a aproximadamente 25 g/l.

Diversos parámetros de fermentación para inocular, cultivar y recuperar microorganismos se discuten con detalle en la Patente de EE.UU. Nº 5.130.242. Se puede usar cualquier método de aislamiento conocido en la actualidad para aislar los microorganismos del medio de fermentación, incluyendo centrifugación, filtración, ultrafiltración, decantación y evaporación de disolvente. Los presentes autores han encontrado que debido a dicha alta densidad de biomasa que resulta de los procedimientos de la presente invención, cuando se usa una centrífuga para recuperar los microorganismos se prefiere diluir el medio de fermentación por adición de agua, que reduce la densidad de biomasa, permitiendo de ese modo una separación más eficaz de los microorganismos del medio de fermentación.

Las muy altas densidades de biomasa conseguidas en la presente invención también facilitan los procedimientos "sin disolvente" para la recuperación de lípidos microbianos. Los procedimientos preferidos para lisar las células en el fermentador se describen en la Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. Nº de Serie 60/177.125 titulada "SOLVENTLESS EXTRACTION PROCESS" presentada el 19 de enero de 2.000, la Solicitud de Patente de EE.UU. Nº de Serie 09/766.500 titulada "SOLVENTLESS EXTRACTION PROCESS" presentada el 19 de enero de 2.001 (ahora Patente de EE.UU. Nº 6.750.048) y la Publicación de Patente Internacional PCT Nº WO 01/53.512 titulada "SOLVENTLESS EXTRACTION PROCESS" presentada el 19 de enero de 2.001. Los procedimientos preferidos para recuperar los lípidos una vez que las células se permeabilizan, se rompen o se lisan en el fermentador (que permite que se rompa la emulsión de lípidos y que se recupere la fracción rica en lípidos) incluyen el procedimiento de desaceitado señalado líneas generales en la Patente Internacional WO 96/05278. En este procedimiento, se añade un compuesto soluble en agua, por ejemplo, alcohol o acetona, a la emulsión de aceite/agua para romper la emulsión y se separa la mezcla resultante por separación por gravedad, por ejemplo, centrifugación. Este procedimiento también se puede modificar para usar otros agentes (solubles en agua y/o lípidos) para romper la emulsión.

Alternativamente, se recuperan los microorganismos en una forma seca a partir del medio de fermentación por evaporación de agua del medio de fermentación, por ejemplo, poniendo en contacto el medio de fermentación directamente (es decir, sin concentración previa, por ejemplo, por centrifugación) con un secador tal como un aparato secador de tambor, es decir, un procedimiento de recuperación de secador de tambor directo. Cuando se usa el procedimiento de recuperación de secador de tambor directo para aislar los microorganismos, típicamente se emplea un secador de tambor calentado con vapor. Además cuando se usa el procedimiento de recuperación de secador de tambor directo, la densidad de biomasa del medio de fermentación es preferiblemente al menos aproximadamente 130 g/l, más preferiblemente al menos aproximadamente 150 g/l y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 180 g/l. Esta alta densidad de biomasa se desea en general para el procedimiento de recuperación de secador de tambor directo debido a una densidad de biomasa menor, el medio de fermentación comprende una cantidad suficiente de agua para enfriar el tambor significativamente, dando como resultado así un secado incompleto de los microorganismos. Otros métodos de secado de células, incluyendo secado por atomización, son conocidos para un experto en la materia.

Los procedimientos de la presente invención proporcionan un régimen de producción de lípidos promedio de al menos aproximadamente 0,5 g/l/h, preferiblemente al menos aproximadamente 0,7 g/l/h, más preferiblemente al menos aproximadamente 0,9 g/l/h y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 1,0 g/l/h. Por otra parte, los lípidos producidos por los procedimientos de la presente invención contienen lípidos poliinsaturados en la cantidad mayor que aproximadamente 15%, preferiblemente mayor que aproximadamente 20%, más preferiblemente mayor que aproximadamente 25%, incluso más preferiblemente mayor que aproximadamente 30% y lo más preferiblemente mayor que aproximadamente 35%. Los lípidos se pueden recuperar de microorganismos secos o de los microorganismos en el medio de fermentación. En general, al menos aproximadamente 20% de los lípidos producidos por los microorganismos en los procedimientos de la presente invención son ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y/u omega-6, preferiblemente al menos aproximadamente 30% de los lípidos son ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y/u omega-6, más preferiblemente al menos aproximadamente 40% de los lípidos son ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y/u omega-6 y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 50% de los lípidos son ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y/u omega-6. Alternativamente, los procedimientos de la

presente invención pueden proporcionar un régimen de producción de ácido graso omega-3 promedio (por ej., DHA) de al menos aproximadamente 0,2 g de ácido graso omega-3 (por ej., DHA)/l/h, preferiblemente al menos aproximadamente 0,3 g de ácido graso omega-3 (por ej., DHA)/l/h, más preferiblemente al menos aproximadamente 0,4 g de ácido graso omega-3 (por ej., DHA)/l/h y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 0,5 g de ácido graso omega-3 (por ej., DHA)/l/h. Alternativamente, los procedimientos pueden proporcionar un régimen de producción de ácido graso omega-6 promedio (por ej., DPAn-6) de al menos aproximadamente 0,07 g de ácido graso omega-6 (por ej., DPAn-6)/l/h, preferiblemente al menos aproximadamente 0,1 g de ácido graso omega-6 (por ej., DPAn-6)/l/h, más preferiblemente al menos aproximadamente 0,13 g de ácido graso omega-6 (por ej., DPAn-6)/l/h y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 0,17 g de ácido graso omega-6 (por ej., DPAn-6)/l/h. Más alternativamente, al menos aproximadamente 25% del lípido es DHA (basado en éster metílico de ácido graso total), preferiblemente al menos aproximadamente 30%, más preferiblemente al menos aproximadamente 35% y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 40%.

Los microorganismos, lípidos extraídos de ahí, la biomasa que queda después de extracción de lípidos o combinaciones de los mismos se pueden usar directamente como un ingrediente alimenticio, tal como un ingrediente en bebidas, salsas, alimentos con base láctea (tales como leche, yogur, queso y helado) y productos horneados; suplemento nutricional (en formas de cápsula o comprimido); alimentación o suplemento alimenticio para cualquier animal cuya carne o productos son consumidos por seres humanos; suplemento alimenticio, incluyendo alimentos infantiles y leche maternizada y productos farmacéuticos (en aplicación de tratamiento directo o adjunto). El término "animal" significa cualquier organismo que pertenece al reino Animalia e incluye, sin limitación, cualquier animal del que procede carne de ave de corral, marisco, ternera, cerdo o cordero. El marisco es derivado de, sin limitación, pescado, camarones y crustáceos. El término "productos" incluye cualquier producto distinto de carne derivado de tales animales, incluyendo, sin limitación, huevos, leche u otros productos. Cuando se alimentan dichos animales, se pueden incorporar lípidos poliinsaturados a la carne, leche, huevos u otros productos de esos animales para aumentar el contenido de estos lípidos.

Ejemplos

La cepa de *Schizochytrium* usada en estos ejemplos produce dos ácidos polienoicos principales, DHAn-3 y DPAn-6 en la relación de en general aproximadamente 3:1 y pequeñas cantidades de otros ácidos polienoicos, tales como EPA y C20:3, en una amplia variedad de condiciones de fermentación. Así, aunque los siguientes ejemplos sólo enumeran la cantidad de DHA, se puede calcular fácilmente la cantidad de DPA(n-6) producida usando la relación ya descrita.

Ejemplo 1

Este ejemplo ilustra el efecto del contenido de oxígeno en un medio de fermentación sobre la productividad de lípidos.

Se midieron los resultados de la fermentación de *Schizochytrium* ATCC Nº 20888 a diversos niveles de contenido de oxígeno disuelto. Los resultados se presentan en la Figura 1, donde CRA es concentración residual de azúcar y PCS es peso seco celular.

Ejemplo 2

Este ejemplo también ilustra el efecto de contenido en oxígeno bajo en el medio de fermentación sobre el contenido en DHA (% en peso seco) del producto de biomasa final.

Se realizó un experimento de tipo "a escala reducida" en matraces Erlenmeyer de 250 ml para imitar el efecto del bajo contenido de oxígeno sobre el contenido de DHA en células *Schizochytrium* sp., cultivadas en fermentadores a gran escala. Se cultivó S*chizochytrium* sp (ATCC 20888) en un medio O4-4. Este medio de cultivo consistió en lo siguiente sobre una base por litro disuelta en agua desionizada: Na_2SO_4 12,61 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,2 g; KCl 0,25 g; $CaCl_2$ 0,05 g; glutamato monosódico 7,0 g; glucosa 10 g; KH_2PO_4 0,5 g; $NaHCO_3$ 0,1 g; extracto de levadura 0,1 g; mezcla de vitaminas 1,0 ml; metales PII 1,00 ml. La mezcla de metales PII contiene (por litro): 6,0 g de Na_2AEDT, 0,29 g de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 6,84 g de H_3BO_3, 0,86 g de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0,06 g de $ZnCl_2$, 0,026 g de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,052 g de $NiSO_4 \cdot H_2O$, 0,002 de $CuSO_4 \cdot H_2O$ y 0,005 g de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$. La mezcla de vitaminas contiene (por litro): 100 mg de tiamina, 0,5 mg de biotina y 0,5 mg de cianocobalamina. El pH del medio de cultivo se ajustó a 7,0 y se esterilizó después por filtrado.

La idea detrás de este experimento a escala reducida fue cultivar las células en matraces de agitación con diferentes volúmenes de medio de cultivo en los matraces - los matraces casi llenos (por ej., 200 ml en un matraz de agitación de 250 ml) no mezclarían bien sobre una mesa oscilatoria y por lo tanto a medida que crecen las células se generarían condiciones de oxígeno disuelto bajo. Por lo tanto, se establecieron 4 tratamientos en el experimento, cada uno realizado por duplicado: (1) se cargaron matraces de 250 ml con 50 ml de medio de cultivo; (2) se cargaron matraces de 250 ml con 100 ml de medio de cultivo; (3) se cargaron matraces de 250 ml con 150 ml de medio de cultivo y (4) se cargaron matraces de agitación de 250 ml con 200 ml de medio de cultivo. Cada uno de los ocho matraces se inoculó con células de un cultivo de 48 horas de *Schizochytrium* cultivado en medio O4-4 en las

condiciones del tratamiento 1 y a 28°C y 23 rad/s (220 rpm) en una mesa oscilatoria. Los ocho matraces del experimento se pusieron en una mesa oscilatoria [23 rad/s (220 rpm)] en una incubadora (28°C) y se cultivaron durante 48 horas en la oscuridad. Al final del experimento, se midieron los niveles de oxígeno disuelto (OD) en cada matraz como medidor de oxígeno disuelto YSI, (YSI Inc.), también se determinó el pH del medio de cultivo y el peso seco celular y su contenido en ácidos grasos también se midió. Los resultados del experimento se indican en líneas generales en la Tabla 1.

Tabla 1. Resultados de experimento a escala reducida que examina el efecto de concentraciones bajas de oxígeno disuelto sobre el contenido en ácidos grasos altamente insaturados de cadena larga (DHA % en peso seco) de *Schizochytrium* sp.

ml de medio	FAME (% TFA)	DHA (% en peso seco)	Biomasa (g/l)	PH Final	OD (% sat)
50	16,5	7,4	4,2	7,4	31
100	17,0	6,5	3,9	7,2	29
150	22,4	9,2	2,7	7,0	11
200	35,9	14,5	1,8	6,9	3

Los resultados indican que el contenido en lípidos (como % FAME) y contenido en DHA (% en peso seco) fueron mayores para células cultivadas a niveles bajos de oxígeno disuelto - cuanto menor el nivel de oxígeno disuelto mayor el contenido en lípidos y DHA. Esto es inesperado debido a que en general se había creído que el oxígeno era necesario para formar enlaces no saturados (dobles). Es sorprendente que se formara tanto DHA a un nivel de oxígeno disuelto bajo, debido a que DHA es uno de los ácidos grasos más insaturados. Aunque la producción de biomasa disminuye a medida que disminuye el nivel de oxígeno disuelto, aumenta el contenido en DHA. Por lo tanto, es ventajoso presentar una fase de crecimiento con niveles de oxígeno disuelto superiores para maximizar la formación de biomasa y disminuir después el nivel de oxígeno disuelto para maximizar la producción de ácidos grasos de cadena larga.

Ejemplo 3

Este ejemplo ilustra la reproducibilidad de los procedimientos de la presente invención.

Se produjeron microorganismos usando fermentadores con un volumen de trabajo nominal de 1.200 galones (4.543 l). Se concentró el caldo de fermentación resultante y se secaron los microorganismos usando un secador de tambor. Se extrajeron lípidos de alícuotas de los microorganismos resultantes y se purificaron para producir un aceite refinado, blanqueado y desodorizado. Se añadieron aproximadamente 3.000 ppm de acetato de d-1-α-tocoferilo para fines de suplemento nutricional previamente a análisis del lípido.

Se realizaron nueve fermentaciones de *Schizochytrium* ATCC Nº 20888 y los resultados se presentan en la Tabla 2. El nivel de oxígeno disuelto fue aproximadamente 8% durante las primeras 24 horas y aproximadamente 4% después.

Tabla 2. Resultados de fermentación alimentada discontinua para la producción de DHA de *Schizochytrium* sp.

Entrada	Periodo (H)	Rendimiento[1] (g/l)	DHA[2] (%)	FAME[3] (%)	Productividad[4]
1	100,3	160,7	17,8	49,5	0,285
2	99,8	172,4	19,4	51,3	0,335
3	84,7	148,7	14,4	41,4	0,253
4	90,2	169,5	19,7	53,9	0,370
5	99,0	164,1	12,5	38,9	0,207
6	113,0	187,1	19,7	47,2	0,326
7	97,0	153,5	13,7	41,0	0,217
8	92,8	174,8	16,4	48,6	0,309

Prom.[5]	97,1	166,4	16,7	46,5	0,288
D.E.[6]	8,4	12,3	2,9	5,4	0,058
CV[7] (%)	8,7	7,4	17,3	11,7	20,2

1. rendimiento real de densidad de biomasa.

2. contenido en DHA como % en peso seco celular.

3. contenido total en ácidos grasos como % en peso seco celular (medido como ésteres metílicos).

4. (gramos de DHA)/l/h.

5. promedio

6. desviación estándar

7. coeficientes de variabilidad. Los valores de los coeficientes de variabilidad por debajo de 5% indican un procedimiento que presenta excelente reproducibilidad, los valores entre 5% y 10% indican un procedimiento que presenta buena reproducibilidad y los valores entre 10% y 20% indican un procedimiento que presenta una reproducibilidad razonable.

Se alimentó jarabe de maíz hasta que el volumen en el fermentador alcanzó aproximadamente 1.200 galones (4.543 l), momento en que se detuvo la adición de jarabe de maíz. Se detuvo el procedimiento de fermentación una vez que la concentración de azúcar residual cayó por debajo de 5 g/l. El periodo típico, desde la inoculación al final, fue aproximadamente 100 horas.

El caldo de fermentación, es decir, el medio de fermentación, se diluyó con agua usando aproximadamente una relación 2:1 para reducir el contenido en cenizas del producto final y ayudar a mejorar la separación de fases durante la etapa de centrifugación. La pasta de células concentradas se calentó a 160° F (aproximadamente 71°C) y se secó en un secador de doble tambor Blaw Knox [(107x91 cm) (42"x36")]. Preferiblemente, sin embargo, los microorganismos se secaron directamente en un secador de tambor sin centrifugación previa.

El resultado de los análisis de lípidos extraídos de alícuotas de cada una de las entradas en la Tabla 2 se resume en la Tabla 3.

Tabla 3. Análisis de la biomasa microbiana producida en las fermentaciones alimentadas discontinuas señaladas en líneas generales en la Tabla 2.

Entrada	% DHA relativo a FAME[1]	Lípido Total % en peso
1	36,0	72,3
2	37,8	70,3
3	34,8	61,5
4	36,5	74,8
5	32,1	52,8
6	41,7	67,7
7	33,4	49,9
8	33,7	61,4
Promedio	35,8	63,8
Desviación Estándar[3]	3,0	9,1
CV[4] (%)	8,5	14,2

1. véase la Tabla 2.

2. véase la discusión anterior.

3. desviación estándar

4. coeficientes de variabilidad. Los valores de los coeficientes de variabilidad por debajo de 5% indican un procedimiento que presenta excelente reproducibilidad, los valores entre 5% y 10% indican un procedimiento que presenta buena reproducibilidad y los valores entre 10% y 20% indican un procedimiento que presenta una reproducibilidad razonable.

A menos que se indique de otro modo, el medio de fermentación usado por toda la sección Ejemplos incluye los siguientes ingredientes, donde el primer número indica concentración objetivo nominal y el número entre paréntesis indica intervalo aceptable: sulfato de sodio 12 g/l (11-13); KCl 0,5 g/l (0,45-0,55); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2 g/l (1,8-2,2); antiespumante Hodag K-60 0,35 g/l (0,3-0,4); K_2SO_4 0,65 g/l (0,60-0,70); KH_2PO_4 1 g/l (0,9-1,1); $(NH_4)_2SO_4$ 1 g/l (0,95-1,1); $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,17 g/l (0,15-0,19); jarabe de maíz 95 DE (base en sólidos) 4,5 g/l (2-10); $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 3 mg/l (2,7-3,3); $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 3 mg/l (2,7-3,3); $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,04 mg/l (0,035-0,045); $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0,04 mg/l (0-0,045); $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 2 mg/l (1,8-2,2); $NiSO_4 \cdot 6H_2O$ 2 mg/l (1,8-2,2); $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 10 mg/l (9-11); tiamina 9,5 mg/l (4-15); vitamina B_{12} 0,15 mg/l (0,05-0,25) y Pantotenato de Calcio 3,2 mg/l (1,3-5,1). Además, se usa disolución de NH_4OH al 28% como fuente de nitrógeno.

El contenido en ceniza de los microorganismos secos es aproximadamente 6% en peso.

Ejemplo 4

Este ejemplo ilustra el efecto del nivel de oxígeno disuelto reducido en el medio de fermentación sobre la productividad de microorganismos en la escala de 14.000 galones (52.996 l).

Usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 3, se realizó una fermentación de volumen nominal 14.000 galones (52.996 l) usando una cepa natural de *Schizochytrium*, que se puede obtener usando procedimientos de aislamiento descritos en las Patentes de EE.UU. Nº 5.340.594 y 5.340.742 ya mencionadas. El nivel de oxígeno disuelto en el medio de fermentación fue aproximadamente 8% durante las primeras 24 horas, aproximadamente 4% desde la 24ª hora a la 40ª hora y aproximadamente 0,5% desde la 40ª hora al final del procedimiento de fermentación. Los resultados de este nivel de oxígeno disuelto menor en procedimientos de medio de fermentación se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Resultados de fermentaciones alimentadas discontinuas de escala de 14.000 galones (52.996 l) de *Schizochytrium* a concentraciones de oxígeno disuelto reducidas.

Entrada	Periodo (H)	Rendimiento (g/l)	% DHA	% FAME	% DHA rel. a FAME	Productividad DHA (g de DHA/l/h)
1	82,0	179,3	21,7	52,4	41,4	0,474
2	99,0	183,1	22,3	55,0	40,5	0,412
3	72,0	159,3	-	-	40,9	-
4	77,0	161,3	-	-	43,2	-
5	100,0	173,0	23,9	53,3	44,9	0,413
6	102,0	183,3	21,6	50,8	42,6	0,388
7	104,0	185,1	23,7	55,0	43,1	0,422
8	88,0	179,3	22,3	52,6	42,4	0,454
9	100,0	166,4	22,5	53,5	42,1	0,374
10	97,0	182,6	22,8	51,6	44,1	0,429
11	87,5	176,5	19,8	45,6	43,5	0,399
12	67,0	170,8	18,8	48,1	39,1	0,479
13	97,0	184,9	23,2	52,7	44,0	0,442

14	102,0	181,9	23,6	52,9	44,6	0,421
15	102,0	186,9	19,9	47,8	41,8	0,365
16	97,0	184,4	19,6	45,5	43,0	0,373
17	98,0	174,7	19,7	45,1	43,7	0,351
18	103,5	178,8	18,3	44,5	41,2	0,316
19	102,0	173,7	15,8	43,1	36,7	0,269
20	94,0	190,4	19,3	46,9	41,1	0,391
21	72,0	172,5	22,8	52,8	43,2	0,546
22	75,0	173,1	21,0	51,7	40,8	0,485
23	75,0	152,7	20,3	50,3	40,4	0,413
24	75,5	172,5	21,9	51,7	42,3	0,500
25	61,0	156,4	17,3	45,7	37,8	0,444
26	74,5	150,6	20,2	50,1	40,2	0,408
27	70,5	134,3	14,8	40,6	36,6	0,282
28	75,5	146,1	21,3	49,7	42,8	0,412
29	82,0	174,3	21,4	50,4	42,5	0,455
30	105,0	182,3	21,7	50,7	42,8	0,377
31	66,0	146,2	16,4	44,6	36,7	0,363
Prom.	87,2	171,5	20,6	49,5	41,6	0,409
D.E.	13,9	14,1	2,4	3,8	2,3	0,061
CV	16,0%	8,2%	11,6%	7,7%	5,5%	15,0%

Ejemplo 5

Este ejemplo ilustra el efecto del nivel de oxígeno disuelto reducido en el medio de fermentación sobre la productividad de los microorganismos en una escala de 41.000 galones (155.202 l).

Se emplearon los mismos procedimientos que en el Ejemplo 4 excepto que se realizó la fermentación en un fermentador de 41.000 galones (155.202 l). Se aumentaron los volúmenes de los medios de cultivo para mantener las concentraciones de compuestos fijadas como objetivo en esta escala. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Fermentación a escala de 41.000 galones (155.202 l) de *Schizochytrium*

Entrada	Periodo (H)	Rendimiento (g/l)	% DHA	% FAME	% DHA rel. a FAME	Productividad DHA (g de DHA/l/h)
1	75,0	116,1	17,3	46,1	37,4	0,268
2	99,0	159,3	17,4	47,0	37,1	0,280
3	103,0	152,6	16,0	47,2	33,8	0,237
4	68,0	136,8	17,9	45,9	39,1	0,360

5	84,0	142,0	17,5	47,0	37,2	0,296
Prom.	85,8	141,4	17,2	46,6	36,9	0,288
D.E.	15,1	16,6	0,7	0,6	1,9	0,046
CV	17,5%	11,8	4,2%	1,3%	5,2%	15,8%

Ejemplo 6

Este ejemplo ilustra el efecto de nitrógeno extra sobre el procedimiento de fermentación de la presente invención.

Se realizaron cuatro series de experimentos alimentados discontinuos a escala de 250 l usando un procedimiento similar al del Ejemplo 4. Se realizaron dos experimentos de control y dos experimentos conteniendo amoníaco extra (x1,15 y x1,25 la cantidad normal). Los resultados se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Efectos de amoníaco extra sobre la fermentación de *Schizochytrium.*

Periodo (H)	Rendimiento (g/l)	Productividad Biomasa	Eficacia conversión	Contenido DHA	Contenido FAME	Productividad DHA
Objetivo de azúcar: 7 g/l, Valor de ajuste pH alcalino: 5,5, Valor de ajuste pH ácido: 7,3, NH_3 x1,0						
48	178	3,71 g/l/h	51,5%	10,7%	37,8%	0,40 g/l/h
60	185	3,08 g/l/h	46,9%	16,3%	47,2%	0,50 g/l/h
72	205	2,85 g/l/h	45,2%	17,4%	47,4%	0,50 g/l/h
84	219	2,61 g/l/h	43,8%	17,1%	45,5%	0,45 g/l/h
90	221	2,46 g/l/h	44,1%	18,4%	48,9%	0,45 g/l/h
Objetivo de azúcar: 7 g/l, Valor de ajuste pH alcalino: 5,5, Valor de ajuste pH ácido: 7,3, NH_3 x1,15						
48	171	3,56 g/l/h	55,6%	12,0%	36,3%	0,43 g/l/h
60	197	3,28 g/l/h	54,6%	9,4%	38,4%	0,31 g/l/h
72	191	2,65 g/l/h	52,8%	9,4%	40,0%	0,25 g/l/h

(continuación)

Periodo (H)	Rendimiento (g/l)	Productividad Biomasa	Eficacia conversión	Contenido DHA	Contenido FAME	Productividad DHA
84	190	2,26 g/l/h	52,5%	10,0%	42,5%	0,23 g/l/h
90	189	2,10 g/l/h	52,2%	9,2%	43,3%	0,19 g/l/h
Objetivo de azúcar: 7 g/l, Valor de ajuste pH alcalino: 5,5, Valor de ajuste pH ácido: 7,3, NH_3 x1,25						
48	178	3,71 g/l/h	56,4%	11,5%	33,7%	0,43 g/l/h
60	179	2,98 g/l/h	48,6%	10,3%	36,0%	0,31 g/l/h
72	180	2,50 g/l/h	48,8%	12,0%	37,6%	0,30 g/l/h
84	181	2,15 g/l/h	46,1%	13,6%	40,1%	0,29 g/l/h
90	185	2,06 g/l/h	45,7%	12,6%	40,7%	0,26 g/l/h
Objetivo de azúcar: 7 g/l, Valor de ajuste pH alcalino: 5,5, Valor de ajuste pH ácido: 7,3, NH_3 x1,0						

48	158	3,29 g/l/h	55,7%	13,1%	36,5%	0,43 g/l/h
60	174	2,90 g/l/h	48,9%	17,9%	39,2%	0,52 g/l/h
72	189	2,63 g/l/h	45,7%	21,0%	39,4%	0,55 g/l/h
84	196	2,33 g/l/h	44,1%	22,4%	40,1%	0,52 g/l/h
90	206	2,29 g/l/h	44,8%	22,1%	40,3%	0,51 g/l/h

En general, el nitrógeno extra presenta un efecto negativo sobre la realización de fermentación, ya que se observaron reducciones significativas en la productividad de DHA para los dos lotes en los que se añadió amoníaco extra. Como se muestra en la Tabla 6, los lotes de control dieron como resultado niveles finales de DHA de 18,4% y 22,1% del peso seco celular total frente al 9,2% (amoníaco x1,15) y 12,6% (amoníaco x1,25) para lotes enriquecidos en nitrógeno extra.

Ejemplo 7

Este ejemplo muestra un perfil cinético de un procedimiento de fermentación de la presente invención.

Se realizó un experimento alimentado discontinuo a escala de 1.000 galones (3.785 l) usando un procedimiento similar al del Ejemplo 4. El perfil cinético del procedimiento de fermentación se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Perfil cinético para una fermentación Alimentada Discontinua a escala de 1.000 galones (3.785 l) de *Schizochytrium.*

Periodo (h)	Rendimiento (g/l)	Productividad Biomasa	Eficacia Conversión	Contenido % DHA	Contenido % FAME	Productividad DHA
24	118	4,92 g/l/h	78,2%	7,4	18,8	0,36 g/l/h
30	138	4,60 g/l/h	60,3%	10,6	30,9	0,49 g/l/h
36	138	3,83 g/l/h	46,6%	11,6	36,5	0,44 g/l/h
42	175	4,17 g/l/h	49,8%	13,4	41,7	0,56 g/l/h
48	178	3,71 g/l/h	45,1%	18,7	52,8	0,69 g/l/h
48*	164	3,42 g/l/h	41,5%	15,3	33,1	0,52 g/l/h
54	196	3,63 g/l/h	45,7%	16,6	51,2	0,60 g/l/h
60	190	3,17 g/l/h	41,7%	16,9	33,9	0,54 g/l/h
72	189	2,62 g/l/h	39,1%	15,6	31,8	0,41 g/l/h
84	195	2,32 g/l/h	38,5%	16,4	32,7	0,38 g/l/h
90	200	2,22 g/l/h	39,0%	18,8	33,3	0,42 g/l/h
90	171	1,90 g/l/h	33,3%	22,2	61,6	0,42 g/l/h **

* Se analizaron dos muestras separadas a las 48 horas.

** Esto es para una muestra de pesos secos celulares lavadas (PCS). Otros valores indicados son para muestras no lavadas.

Ejemplo 8

Este ejemplo ilustra el efecto de la cantidad de fuente de carbono sobre la productividad.

Se realizaron tres procedimientos de fermentación diferentes usando el procedimiento del Ejemplo 4 usando diversas cantidades de fuente de carbono. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Resultados de la fermentación para diversas cantidades de fuente de carbono sobre la fermentación de

Schizochytrium.

Periodo (h)	Rendimiento (g/l)	Carga de Carbono	Eficacia Conversión	Contenido % DHA	Contenido % FAME	Productividad (g/l/h)
90	171	51,3%	33,3%	22,2	61,6	0,42
94	122	40,5%	30,1%	19,1	57,3	0,25
59	73	20,0%	36,5%	11,9	40,8	0,15

Ejemplo 9

Este ejemplo ilustra el efecto de la limitación de nutriente sobre la eficacia de conversión de carbono en biomasa, lípido y lo más específicamente DHA.

Se realizó un experimento de cultivo continuo para investigar el efecto de la limitación de nutriente cultivando *Schizochytrium* ATCC Nº 20888 en un fermentador Applikon de 2 l de volumen en medio de crecimiento basal (ICM-2) que consistía en los siguientes compuestos (concentración nominal): ingredientes del Grupo I: Na_2SO_4 (18,54 g/l), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (2,0 g/l) y KCl (0,572 g/l); ingredientes del Grupo II (cada uno preparado por separado): glucosa (43,81 g/l), KH_2PO_4 (1,28 g/l), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,025 g/l) y $(NH_4)_2SO_4$ (6,538 g/l); ingredientes del Grupo III: Na_2AEDT (6,0 mg/l), $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (0,29 mg/l), H_3BO_3 (6,84 mg/l), $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (0,86 mg/l), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,237 mg/l), $CoCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,026 mg/l), $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (0,005 mg/l), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,002 mg/l) y $NiSO_4 \cdot 6H_2O$ (0,052 mg/l) e ingredientes del Grupo IV: tiamina HCl (0,2 mg/l), Vitamina B_{12} (0,005 mg/l), Pantotenato de calcio (0,2 mg/l). Los Grupos I y II fueron esterilizados en autoclave, mientras que los Grupos III y IV se esterilizaron por filtración previamente a la adición al fermentador. El medio de cultivo se inoculó después con *Schizochytrium* y se cultivó en condiciones controladas de 30°C, pH 5,5 y oxígeno disuelto de 20% de saturación hasta que se consiguió una densidad de células máxima.

Después se estableció un modo de operación continuo bombeando simultáneamente medio de alimentación ICM-2 estéril al fermentador y retirando el caldo conteniendo células de *Schizochytrium* a un caudal suficiente para mantener una velocidad de dilución de 0,06 h^{-1}, hasta que se consiguió un estado estacionario. Para investigar el efecto de limitación de nutriente, se disminuyó el compuesto que contenía el nutriente requerido especificado en el medio de alimentación ICM-2 de manera que se agotara este nutriente en el caldo que contenía células de salida, de manera que el crecimiento de las células estuviera limitado por ausencia del nutriente requerido particular. Una vez que se estableció la operación de estado estacionario para cada condición, se midieron las concentraciones de biomasa seca del caldo, glucosa residual y nutriente limitante, el contenido en lípidos de la célula y el contenido en DHA de las células. La eficacia de conversión de glucosa en biomasa se calculó dividiendo la glucosa total consumida por la biomasa seca total formada y se expresó sobre una base en porcentaje.

Los efectos de crecimiento limitante por cada nutriente individual se estudiaron repitiendo este experimento para cada nutriente individual enumerado en la tabla siguiente. Los resultados finales se resumen en la tabla siguiente:

Tabla 9. Efecto de limitación de nutriente sobre el rendimiento de biomasa, eficacia de conversión (glucosa -> biomasa), contenido en lípidos y contenido en DHA de *Schizochytrium* sp.

Nutriente Limitante	Biomasa[1] (g/l)	$Y_{x/s}$[2]	CRA[3] (g/l)	Contenido en Lípidos[4] (%)	Contenido en DHA[5] (%)
Glucosa	18,7	46,8	0,0	19,8	7,3
Nitrógeno	14,5	36,3	0,6	47,5	10,3
Fosfato	17,8	44,5	0,8	37,0	8,2
Tiamina	7,5	18,8	7,7	11,1	4,0
Cinc	16,0	40,0	1,3	27,8	7,2
Cobre	14,0	35,0	10,4	13,8	5,3
Cobalto	14,5	36,3	0,0	22,2	6,9
Níquel	17,8	44,5	0,0	21,9	8,0

Hierro	15,9	39,8	3,5	18,5	7,2
Manganeso	12,5	31,3	3,4	26,1	8,0
Magnesio	13,9	34,8	5,3	18,7	6,4
Calcio	16,7	41,8	4,3	18,7	6,4
Vitamina B12	19,6	49,0	0,0	17,5	6,3
Molibdeno	18,9	47,3	0,0	19,3	7,0
Pantotenato	19,2	48,0	0,0	20,4	6,7
Sodio	17,9	44,8	1,8	21,8	8,2
Potasio	13,0	32,5	8,8	14,1	5,3

1. concentración de biomasa seca (gramos/litro)

2. coeficiente de rendimiento (% biomasa producida/glucosa consumida)

3. concentración en glucosa residual en caldo (gramos/litro)

4. contenido en lípidos de biomasa seca (g de lípido (como FAME)/g de biomasa seca)

5. contenido en DHA de biomasa seca (g de DHA/g de biomasa seca)

Es evidente a partir de la tabla que la limitación de nitrógeno dio como resultado la más alta acumulación de DHA en las células, seguido por fosfato, sodio, níquel, manganeso, glucosa (carbono), cinc e hierro. Esta información se puede emplear comercialmente por alimentación de uno o más de estos nutrientes a una fermentación discontinua a una velocidad suficiente para limitar el crecimiento de las células. En el caso más preferido, se alimenta nitrógeno de una manera limitante a la fermentación discontinua para maximizar el contenido en DHA de las células. Otros nutrientes (o mezclas de los mismos) se pueden alimentar de una manera limitante para maximizar la producción de biomasa u otros productos valiosos. Otros elementos o nutrientes requeridos biológicamente que no se evaluaron, tales como azufre, también se podían emplear como nutrientes limitantes en esta estrategia de control de la fermentación.

Ahora se describirán varias características y realizaciones preferidas con referencia a los siguientes párrafos (párr.) numerados.

1. Un procedimiento para producir lípidos que contienen ácidos grasos polienoicos a partir de microorganismos eucariotas capaces de producir al menos aproximadamente 20% de su biomasa como lípidos, que comprende añadir a un medio de fermentación que comprende dichos microorganismos una fuente de carbono no alcohol y una fuente de nutriente limitante a una velocidad suficiente para aumentar la densidad de biomasa de dicho medio de fermentación a al menos aproximadamente 100 g/l.

2. El procedimiento del párrafo 1, en el que dicho procedimiento comprende una fase de aumento de la densidad de biomasa y una fase de producción, en el que dicha fase de aumento de la densidad de biomasa comprende añadir dicha fuente de carbono y dicha fuente de nutriente limitante y dicha fase de producción comprende añadir dicha fuente de carbono sin nada o con poco de dicha fuente de nutriente limitante adicional para inducir condiciones limitantes de nutriente que induzcan la producción de lípidos.

3. El procedimiento del párrafo 2, en el que la cantidad de oxígeno disuelto presente en dicho medio de fermentación durante dicha fase de producción es menor que la cantidad de oxígeno disuelto presente en dicho medio de fermentación durante dicha fase de aumento de la densidad de biomasa.

4. El procedimiento del párrafo 3, en el que la cantidad de oxígeno disuelto en dicho medio de fermentación durante dicha fase de aumento de la densidad de biomasa es al menos aproximadamente 4%.

5. El procedimiento del párrafo 4, en el que la cantidad de oxígeno disuelto en dicho medio de fermentación durante dicha fase de producción es menor que aproximadamente 1%.

6. El procedimiento del párrafo 1, en el que dicha fuente de carbono no alcohol comprende un carbohidrato.

7. El procedimiento del párrafo 1, en el que dicha fuente de nutriente limitante se selecciona del grupo que consiste en: fuentes de nitrógeno, fuentes de carbono, fuentes de fosfato, fuentes de vitaminas (tales como fuentes de vitamina B12, fuentes de pantotenato, fuentes de tiamina), fuentes de metales traza (tales como fuentes de cinc, fuentes de cobre, fuentes de cobalto, fuentes de níquel, fuentes de hierro, fuentes de manganeso, fuentes de

molibdeno) y fuentes de metales principales (tales como fuentes de magnesio, fuentes de calcio, fuentes de sodio, fuentes de potasio), fuentes de sílice y mezclas de los mismos.

8. El procedimiento del párrafo 7, en el que dichas fuentes de metales traza y fuentes de metales principales se seleccionan del grupo que consiste en sales de sulfato y cloruro de estos metales (tales como $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; $NiSO_4 \cdot 6H_2O$; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; $CaCl_2$; K_2SO_4; KCl y Na_2SO_4) y mezclas de los mismos.

9. El procedimiento del párrafo 1, en el que dicha fuente de nutriente limitante comprende una fuente de nitrógeno.

10. El procedimiento del párrafo 9, en el que dicha fuente de nitrógeno comprende una sal de amonio inorgánica.

11. El procedimiento del párrafo 9, en el que dicha fuente de nitrógeno comprende hidróxido de amonio.

12. El procedimiento del párrafo 10, en el que el pH del medio de fermentación se controla por dicha fuente de nutriente limitante.

13. El procedimiento del párrafo 1, en el que dicho medio de fermentación está a una temperatura de al menos aproximadamente 20ºC.

14. El procedimiento del párrafo 1, en el que dicho procedimiento produce lípidos a una velocidad promedio de al menos aproximadamente 0,5 g/l/h.

15. El procedimiento del párrafo 14, en el que al menos aproximadamente el 15% de dichos lípidos son lípidos poliinsaturados.

16. El procedimiento del párrafo 14, en el que la cantidad total de ácidos grasos omega-3 y omega-6 es al menos aproximadamente el 20% de dichos lípidos.

17. El procedimiento del párrafo 14, en el que al menos aproximadamente 25% de dichos lípidos es ácido docosahexaenoico.

18. El procedimiento del párrafo 1, en el que dichos microorganismos se seleccionan del grupo que consiste en: algas; hongos (incluyendo levaduras), protistas, bacterias y mezclas de los mismos, en el que dichos microorganismos son capaces de producir ácidos grasos polienoicos u otros lípidos que en general se había creído que requerían oxígeno para su síntesis.

19. El procedimiento del párrafo 18, en el que dichos microorganismos son capaces de producir lípidos a un nivel de oxígeno del medio de fermentación de aproximadamente menos del 3% de saturación.

20. El procedimiento del párrafo 18, en el que dichos microorganismos se cultivan en un procedimiento de alimentación discontinua.

21. El procedimiento del párrafo 20, que comprende además mantener un nivel de oxígeno menor que aproximadamente el 3% de saturación en dicho medio de fermentación durante la fase de producción de dicho procedimiento de fermentación.

22. El procedimiento del párrafo 1, en el que dichos microorganismos son microalgas y microorganismos de tipo alga.

23. El procedimiento del párrafo 1, en el que dichos microorganismos son Stramenopiles.

24. El procedimiento del párrafo 1, en el que dichos microorganismos son del orden Thraustochytriales.

25. El procedimiento del párrafo 1, en el que dichos microorganismos se seleccionan del grupo que consiste en: Thraustochytrium, Schizochytrium y mezclas de los mismos.

26. Un procedimiento para cultivar microorganismos eucariotas capaces de producir al menos aproximadamente el 20% de su biomasa como lípidos, comprendiendo dicho procedimiento añadir a un medio de fermentación que comprende dichos microorganismos una fuente de carbono y una fuente de nutriente limitante a una velocidad suficiente para aumentar la densidad de biomasa de dicho medio de fermentación a al menos aproximadamente 100 g/l, en el que dicho procedimiento produce al menos una velocidad promedio de aproximadamente 0,5 g/l/h de lípidos y en el que al menos aproximadamente el 15% de los lípidos totales producidos por dichos microorganismos son lípidos poliinsaturados.

27. El procedimiento del párrafo 26, en el que dicho procedimiento comprende además:

(a) una fase de aumento de la densidad de biomasa, en la que el nivel de oxígeno disuelto en el medio de fermentación es al menos aproximadamente 4% y

(b) una fase de alta producción de lípidos, en la que el nivel de oxígeno disuelto en el medio de fermentación es menor que aproximadamente el 1%.

28. El procedimiento del párrafo 26, en el que dicha fuente de carbono es una fuente de carbono no alcohol.

29. El procedimiento del párrafo 26, en el que dicha fuente de nutriente limitante se selecciona del grupo que consiste en: fuentes de nitrógeno, fuentes de carbono, fuentes de fosfato, fuentes de vitaminas (tales como fuentes de vitamina B12, fuentes de pantotenato, fuentes de tiamina), fuentes de metales traza (tales como fuentes de cinc, fuentes de cobre, fuentes de cobalto, fuentes de níquel, fuentes de hierro, fuentes de manganeso, fuentes de molibdeno) y fuentes de metales principales (tales como fuentes de magnesio, fuentes de calcio, fuentes de sodio, fuentes de potasio) y fuentes de sílice y mezclas de los mismos.

30. El procedimiento del párrafo 29, en el que dichas fuentes de metales traza y fuentes de metales principales se seleccionan del grupo que consiste en sales de sulfato y cloruro de estos metales (tales como $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; $NiSO_4 \cdot 6H_2O$; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; $CaCl_2$; K_2SO_4; KCl y Na_2SO_4) y mezclas de los mismos.

31. El procedimiento del párrafo 26, en el que dicha fuente de nutriente limitante comprende una fuente de nitrógeno.

32. El procedimiento del párrafo 31, en el que dicha fuente de nitrógeno comprende una sal de amonio inorgánica.

33. El procedimiento del párrafo 26, en el que dichos microorganismos se seleccionan del grupo que consiste en: algas, hongos (incluyendo levadura), protistas, bacterias y mezclas de los mismos,

en el que dichos microorganismos son capaces de producir ácidos grasos polienoicos u otros lípidos que en general se había creído que requerían oxígeno para su síntesis.

34. El procedimiento del párrafo 26, en el que dichos microorganismos son Stramenopiles.

35. El procedimiento del párrafo 26, en el que dichos microorganismos son microalgas.

36. El procedimiento del párrafo 26, en el que dichos microorganismos son del orden Thraustochytriales.

37. El procedimiento del párrafo 26, en el que dichos microorganismos se seleccionan del grupo que consiste en: Thraustochytrium, Schizochytrium y mezclas de los mismos.

38. El procedimiento del párrafo 26, en el que la cantidad total de ácidos grasos omega-3 y omega-6 es al menos aproximadamente el 20 % de dichos lípidos.

39. El procedimiento del párrafo 26, en el que al menos aproximadamente el 25 % de dichos lípidos es ácido docosahexaenoico.

40. Un procedimiento para cultivar microorganismos eucariotas que comprende añadir a un medio de fermentación que comprende dichos microorganismos una fuente de carbono y una fuente de nutriente limitante a una velocidad suficiente para aumentar la densidad de biomasa de dicho medio de fermentación a al menos aproximadamente 100 g/l, en el que dichos microorganismos se seleccionan del grupo que consiste en: algas, hongos (incluyendo levadura), protistas, bacterias y mezclas de los mismos, y en el que dichos microorganismos son capaces de producir al menos aproximadamente el 20% de su biomasa como lípidos comprendiendo algunos ácidos grasos polienoicos.

41. El procedimiento del párrafo 40, en el que dicho procedimiento produce lípidos microbianos a una velocidad promedio de al menos aproximadamente 0,5 g/l/h.

42. El procedimiento del párrafo 41, en el que más de aproximadamente el 15% de dichos lípidos son lípidos poliinsaturados.

43. El procedimiento del párrafo 41, en el que la cantidad total de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y omega-6 son al menos aproximadamente el 20% de dichos lípidos.

44. El procedimiento del párrafo 41, en el que al menos aproximadamente el 25% de dichos lípidos es ácido docosahexaenoico.

45. El procedimiento del párrafo 40, en el que dicho procedimiento produce de promedio al menos aproximadamente 0,2 g/l/h de ácido docosahexaenoico.

46. El procedimiento del párrafo 40, en el que dicha fuente de carbono no es un alcohol.

47. El procedimiento del párrafo 46, en el que dicha fuente de carbono es un carbohidrato.

48. El procedimiento del párrafo 40, en el que dicha fuente de nutriente limitante se selecciona del grupo que

consiste en: fuentes de nitrógeno, fuentes de carbono, fuentes de fosfato, fuentes de vitaminas (tales como fuentes de vitamina B12, fuentes de pantotenato, fuentes de tiamina), fuentes de metales traza (tales como fuentes de cinc, fuentes de cobre, fuentes de cobalto, fuentes de níquel, fuentes de hierro, fuentes de manganeso, fuentes de molibdeno) y fuentes de metales principales (tales como fuentes de magnesio, fuentes de calcio, fuentes de sodio, fuentes de potasio), fuentes de sílice y mezclas de los mismos.

49. El procedimiento del párrafo 48, en el que dichas fuentes de metales traza y fuentes de metales principales se seleccionan del grupo que consiste en sales de sulfato y cloruro de estos metales (tales como $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; $NiSO_4 \cdot 6H_2O$; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; $CaCl_2$; K_2SO_4; KCl y Na_2SO_4) y mezclas de los mismos.

50. El procedimiento del párrafo 40, en el que dichas fuentes de nutriente limitante comprenden una fuente de nitrógeno.

51. El procedimiento del párrafo 50, en el que dicha fuente de nitrógeno comprende una sal de amonio inorgánica.

52. El procedimiento del párrafo 40, en el que dicha fuente de nitrógeno comprende hidróxido de amonio.

53. El procedimiento del párrafo 40, en el que dichos microorganismos se seleccionan del grupo que consiste en: algas, hongos (incluyendo levadura), protistas, bacterias y mezclas de los mismos, en el que dichos microorganismos son capaces de producir ácidos grasos polienoicos u otros lípidos que en general se había creído que requerían oxígeno para su síntesis.

54. El procedimiento del párrafo 40, en el que dichos microorganismos son microalgas y microorganismos de tipo alga.

55. El procedimiento del párrafo 40, en el que dichos microorganismos son Stramenopiles.

56. Un procedimiento para producir lípidos microbianos eucariotas que comprende:

(a) cultivar microorganismos eucariotas en un medio de fermentación para aumentar la densidad de biomasa de dicho medio de fermentación a al menos aproximadamente 100 g/l;

(b) proporcionar condiciones de fermentación suficientes para permitir que dichos microorganismos produzcan dichos lípidos y

(c) recuperar dichos lípidos, en el que más de aproximadamente el 15% de dichos lípidos son lípidos poliinsaturados.

57. El procedimiento del párrafo 56, en el que un nivel de oxígeno disuelto en dicho medio de fermentación durante dicha etapa de crecimiento de microorganismos es mayor que el nivel de oxígeno disuelto en el medio de fermentación durante dicha etapa de producción de lípidos.

58. El procedimiento del párrafo 56, en el que el nivel de oxígeno disuelto en dicho medio de fermentación durante la etapa de crecimiento de los microorganismos es al menos aproximadamente el 4%.

59. El procedimiento del párrafo 56, en el que el nivel de oxígeno disuelto en dicho medio de fermentación durante la etapa de producción de lípidos es menor que aproximadamente el 1%.

60. El procedimiento del párrafo 56, en el que dichos microorganismos se seleccionan del grupo que consiste en: algas, hongos (incluyendo levadura), protistas, bacterias y mezclas de los mismos, en el que dichos microorganismos son capaces de producir ácidos grasos polienoicos u otros lípidos que en general se había creído que requerían oxígeno para su síntesis.

61. El procedimiento del párrafo 56, en el que dichos microorganismos son Stramenopiles.

62. El procedimiento del párrafo 56, en el que dichos microorganismos son microalgas y microorganismos de tipo alga.

63. El procedimiento del párrafo 56, en el que dichos microorganismos son del orden Thraustochytriales.

64. El procedimiento del párrafo 56, en el que dichos microorganismos se seleccionan del grupo que consiste en: Thraustochytrium, Schizochytrium y mezclas de los mismos.

65. El procedimiento del párrafo 56, en el que la cantidad total de ácidos grasos omega-3 y omega-6 es al menos aproximadamente el 20% de dichos lípidos microbianos.

66. El procedimiento del párrafo 56, en el que al menos aproximadamente el 25% de dichos lípidos microbianos es ácido docosahexaenoico.

67. El procedimiento del párrafo 56, en el que dicho procedimiento produce ácido docosahexaenoico a una velocidad

promedio de al menos aproximadamente 0,2 g/l/h.

68. El procedimiento del párrafo 56, en el que dicha etapa de recuperación de lípidos comprende:

(d) retirar agua de dicho medio de fermentación para proporcionar microorganismos secos y

(e) aislar dichos lípidos de dichos microorganismos secos.

69. El procedimiento del párrafo 68, en el que dicha etapa de eliminación de agua comprende poner en contacto dicho medio de fermentación directamente en un secador de tambor sin centrifugación previa.

70. El procedimiento del párrafo 56, en el que dicha etapa de recuperación de lípidos comprende:

(d) tratar el caldo de fermentación para permeabilizar, lisar o romper las células microbianas y

(e) recuperar los lípidos del caldo de fermentación por separación por gravedad con o sin la ayuda de un agente para ayudar a la ruptura de la emulsión lípido/agua.

71. El procedimiento del párrafo 70, en el que dichas células microbianas se tratan en la etapa (d) en un fermentador o un recipiente similar.

72. El procedimiento del párrafo 70, en el que dicha separación por gravedad comprende centrifugación.

73. El procedimiento del párrafo 56, en el que dicha etapa de crecimiento de microorganismos comprende añadir una fuente de carbono y una fuente de nutriente limitante.

74. El procedimiento del párrafo 73, en el que dicha fuente de carbono no es alcohol.

75. El procedimiento del párrafo 74, en el que dicha fuente de carbono comprende un carbohidrato.

76. El procedimiento del párrafo 73, en el que dicha fuente de nutriente limitante se selecciona del grupo que consiste en: fuentes de nitrógeno, fuentes de carbono, fuentes de fosfato, fuentes de vitaminas (tales como fuentes de vitamina B12, fuentes de pantotenato, fuentes de tiamina), fuentes de metales traza (tales como fuentes de cinc, fuentes de cobre, fuentes de cobalto, fuentes de níquel, fuentes de hierro, fuentes de manganeso, fuentes de molibdeno) y fuentes de metales principales (tales como fuentes de magnesio, fuentes de calcio, fuentes de sodio, fuentes de potasio), fuentes de sílice y mezclas de los mismos.

77. El procedimiento del párrafo 76, en el que dichas fuentes de metales traza y fuentes de metales principales se seleccionan del grupo que consiste en sales de sulfato y cloruro de estos metales (tales como $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; $NiSO_4 \cdot 6H_2O$; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; $CaCl_2$; K_2SO_4; KCl y Na_2SO_4) y mezclas de los mismos.

78. El procedimiento del párrafo 73, en el que dicha fuente de nutriente limitante comprende una fuente de nitrógeno.

79. El procedimiento del párrafo 78, en el que dicha fuente de nitrógeno comprende una sal de amonio inorgánica.

80. El procedimiento del párrafo 78, en el que dicha fuente de nitrógeno comprende hidróxido de amonio.

81. Un procedimiento para producir lípidos microbianos eucariotas que comprende:

(a) añadir una fuente de carbono no alcohol y una fuente de nutriente limitante a un medio de fermentación que comprende dichos microorganismos;

(b) proporcionar condiciones suficientes para que dichos microorganismos produzcan dichos lípidos microbianos y

(c) recuperar dichos lípidos microbianos,

en el que al menos aproximadamente el 15% de dichos lípidos microbianos son lípidos poliinsaturados.

82. El procedimiento del párrafo 81, en el que el nivel de oxígeno disuelto en dicho medio de fermentación durante una etapa de aumento de densidad de biomasa es mayor que el nivel de oxígeno disuelto en dicho medio de fermentación durante una etapa de producción de lípidos.

83. El procedimiento del párrafo 81, en el que el nivel de oxígeno disuelto en dicho medio de fermentación durante una etapa de aumento de densidad de biomasa es al menos aproximadamente 4%.

84. El procedimiento del párrafo 81, en el que el nivel de oxígeno disuelto en dicho medio de fermentación durante una etapa de producción de lípidos es aproximadamente 1% o menor.

85. El procedimiento del párrafo 81, en el que dichos microorganismos se seleccionan del grupo que consiste en:

algas, hongos (incluyendo levadura), protistas, bacterias y mezclas de los mismos.

86. El procedimiento del párrafo 81, en el que dichos microorganismos se seleccionan del grupo que consiste en: algas, hongos (incluyendo levadura), protistas, bacterias y mezclas de los mismos, en el que dichos microorganismos son capaces de producir ácidos grasos polienoicos u otros lípidos que en general se había creído que requerían oxígeno para su síntesis.

87. El procedimiento del párrafo 81, en el que dichos microorganismos son Stramenopiles.

88. El procedimiento del párrafo 81, en el que dichos microorganismos son microalgas y microorganismos de tipo alga.

89. El procedimiento del párrafo 81, en el que dichos microorganismos son del orden Thraustochytriales.

90. El procedimiento del párrafo 81, en el que dichos microorganismos se seleccionan del grupo que consiste en: Thraustochytrium, Schizochytrium y mezclas de los mismos.

91. El procedimiento del párrafo 81, en el que dicho procedimiento produce dichos lípidos microbianos a una velocidad promedio de al menos aproximadamente 0,5 g/l/h.

92. El procedimiento del párrafo 91, en el que la cantidad total de ácidos grasos omega-3 y omega-6 es al menos aproximadamente el 20% de dichos lípidos microbianos.

93. El procedimiento del párrafo 81, en el que al menos aproximadamente el 25% de dichos lípidos es ácido docosahexaenoico.

94. El procedimiento del párrafo 81, en el que dicho procedimiento produce ácido docosahexaenoico a una velocidad promedio de al menos aproximadamente 0,2 g/l/h.

95. El procedimiento del párrafo 58, en el que dicha etapa de recuperación de lípidos comprende:

(d) retirar agua de dicho medio de fermentación para proporcionar microorganismos secos y

(e) aislar dichos lípidos de dichos microorganismos secos.

96. El procedimiento del párrafo 95, en el que dicha etapa de eliminación de agua comprende evaporar agua de dicho medio de fermentación sin centrifugación previa.

97. El procedimiento del párrafo 81, en el que dicha etapa de recuperación de lípidos comprende:

(d) tratar el caldo de fermentación para permeabilizar, lisar o romper las células microbianas y

(e) recuperar los lípidos del caldo de fermentación por separación por gravedad con o sin la ayuda de un agente para ayudar a la ruptura de la emulsión lípido/agua.

98. El procedimiento del párrafo 97, en el que dichas células microbianas se tratan en la etapa (d) en un fermentador o un recipiente similar.

99. El procedimiento del párrafo 97, en el que dicha separación por gravedad comprende centrifugación.

100. El procedimiento del párrafo 81, en el que dicha fuente de carbono no alcohol comprende un carbohidrato.

101. El procedimiento del párrafo 81, en el que dicha fuente de nutriente limitante se selecciona del grupo que consiste en: fuentes de nitrógeno, fuentes de carbono, fuentes de fosfato, fuentes de vitaminas (tales como fuentes de vitamina B12, fuentes de pantotenato, fuentes de tiamina), fuentes de metales traza (tales como fuentes de cinc, fuentes de cobre, fuentes de cobalto, fuentes de níquel, fuentes de hierro, fuentes de manganeso, fuentes de molibdeno) y fuentes de metales principales (tales como fuentes de magnesio, fuentes de calcio, fuentes de sodio, fuentes de potasio), fuentes de sílice y mezclas de los mismos.

102. El procedimiento del párrafo 101, en el que dichas fuentes de metales traza y fuentes de metales principales se seleccionan del grupo que consiste en sales de sulfato y cloruro de estos metales (tales como $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; $NiSO_4 \cdot 6H_2O$; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; $CaCl_2$; K_2SO_4; KCl y Na_2SO_4) y mezclas de los mismos.

103. El procedimiento del párrafo 81, en el que dicha fuente de nutriente limitante comprende una fuente de nitrógeno.

104. El procedimiento del párrafo 103, en el que dicha fuente de nitrógeno comprende una sal de amonio inorgánica.

105. El procedimiento del párrafo 103, en el que dicha fuente de nitrógeno comprende hidróxido de amonio.

106. Un procedimiento para producir lípidos microbianos eucariotas que comprende:

(a) añadir una fuente de carbono y una fuente de nutriente limitante a un medio de fermentación que comprende microorganismos eucariotas y proporcionar condiciones suficientes para mantener un nivel de oxígeno disuelto de al menos aproximadamente 4% en dicho medio de fermentación para producir una densidad de biomasa de al menos aproximadamente 100 g/l;

(b) proporcionar condiciones suficientes para mantener un nivel de oxígeno disuelto de aproximadamente 1% o menor en dicho medio de fermentación y proporcionar condiciones suficientes para permitir que dichos microorganismos produzcan dichos lípidos y

(c) recuperar dichos lípidos microbianos,

en el que al menos aproximadamente el 15% de dichos lípidos microbianos son lípidos poliinsaturados.

107. El procedimiento del párrafo 106, en el que dichos microorganismos se seleccionan del grupo que consiste en: algas, hongos (incluyendo levadura), protistas, bacterias y mezclas de los mismos.

108. El procedimiento del párrafo 106, en el que dichos microorganismos se seleccionan del grupo que consiste en: algas, hongos (incluyendo levadura), protistas, bacterias y mezclas de los mismos, en el que dichos microorganismos son capaces de producir ácidos grasos polienoicos u otros lípidos que en general se había creído que requerían oxígeno para su síntesis.

109. El procedimiento del párrafo 106, en el que dichos microorganismos son Stramenopiles.

110. El procedimiento del párrafo 106, en el que dichos microorganismos son microalgas y microorganismos de tipo alga.

111. El procedimiento del párrafo 106, en el que dichos microorganismos son del orden Thraustochytriales.

112. El procedimiento del párrafo 106, en el que dichos microorganismos se seleccionan del grupo que consiste en: Thraustochytrium, Schizochytrium y mezclas de los mismos.

113. El procedimiento del párrafo 106, en el que al menos aproximadamente el 20% de dichos lípidos microbianos son ácidos grasos omega-3 y omega-6.

114. El procedimiento del párrafo 106, en el que al menos aproximadamente el 25% de dichos lípidos microbianos es ácido docosahexaenoico.

115. El procedimiento del párrafo 106, en el que dicho procedimiento produce ácido docosahexaenoico a una velocidad promedio de al menos aproximadamente 0,2 g/l/h.

116. El procedimiento del párrafo 106, en el que la etapa de recuperación de lípidos comprende:

(d) retirar agua de dicho medio de fermentación para proporcionar microorganismos secos y

(e) aislar dichos lípidos de dichos microorganismos secos.

117. El procedimiento del párrafo 116, en el que la etapa de eliminación de agua comprende evaporar el agua directamente de dicho medio de fermentación sin centrifugación previa.

118. El procedimiento del párrafo 106, en el que la etapa de recuperación de lípidos comprende:

(d) tratar el caldo de fermentación para permeabilizar, lisar o romper las células microbianas y

(e) recuperar los lípidos del caldo de fermentación por separación por gravedad con o sin la ayuda de un agente para ayudar a la ruptura de la emulsión lípido/agua.

119. El procedimiento del párrafo 106, en el que dichas células microbianas se tratan en la etapa (d) en un fermentador o un recipiente similar.

120. El procedimiento del párrafo 118, en el que dicha separación por gravedad comprende centrifugación.

121. Un método para enriquecer el contenido en ácidos grasos polienoicos de un microorganismo que comprende fermentar dicho microorganismo en un medio de cultivo con un nivel de oxígeno disuelto menor que 10%.

122. El procedimiento del párrafo 121, en el que dicho nivel de oxígeno disuelto es menor que 5 por ciento.

123. El procedimiento del párrafo 121, en el que dicho nivel de oxígeno disuelto es menor que 1 por ciento.

124. El procedimiento del párrafo 121, en el que durante una fase de crecimiento inicial, el nivel de oxígeno disuelto es mayor que aproximadamente 10 por ciento y durante una fase de producción posterior el nivel de oxígeno disuelto es menor que 10 por ciento.

125. El procedimiento del párrafo 121, en el que dicho microorganismo contiene genes de policétido sintasa.

126. Un procedimiento heterotrófico para producir productos y microorganismos que comprende:

a. cultivar dichos microorganismos en un medio de cultivo en el que dichos microorganismos contienen genes de policétido sintasa y

b. mantener el nivel de oxígeno disuelto en menos de aproximadamente 10 por ciento.

127. El procedimiento del párrafo 126, en el que dicho nivel de oxígeno disuelto es menor que aproximadamente 5 por ciento.

128. El procedimiento del párrafo 126, en el que dicho nivel de oxígeno disuelto es menor que aproximadamente 1 por ciento.

129. El procedimiento del párrafo 126, en el que dichos genes de policétido sintasa se encuentran de manera natural en dichos microorganismos.

130. El procedimiento del párrafo 126, en el que dichos genes de policétido sintasa se introducen genéticamente en dichos microorganismos.

131. El procedimiento del párrafo 126, en el que durante una fase de crecimiento inicial, el nivel de oxígeno disuelto es mayor que aproximadamente 10 por ciento y durante una fase de producción posterior el nivel de oxígeno disuelto es menor que aproximadamente 10 por ciento.

REIVINDICACIONES

1. Un método para enriquecer el contenido en ácidos grasos polienoicos de un microorganismo del orden Thraustochytriales que comprende fermentar dicho microorganismo en un medio de cultivo con un nivel de oxígeno disuelto menor que 5% de saturación.

2. El método según la reivindicación 1, en el que dicho nivel de oxígeno disuelto es menor que 3% de saturación.

3. El método según la reivindicación 1 o 2, en el que dicho nivel de oxígeno disuelto es menor que 1% de saturación.

4. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que durante una fase de crecimiento inicial, el nivel de oxígeno disuelto es mayor que aproximadamente 10% y durante una fase de producción posterior el nivel de oxígeno disuelto es menor que 5% de saturación.

5. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho microorganismo contiene genes de policétido sintasa.

6. Un procedimiento heterotrófico para producir productos y microorganismos del orden Thraustochytriales que comprende:

a. cultivar dichos microorganismos en un medio de cultivo en el que dichos microorganismos contienen genes de policétido sintasa; y

b. mantener el nivel de oxígeno disuelto a menos de aproximadamente 5% de saturación.

7. El procedimiento según la reivindicación 6, en el que dicho nivel de oxígeno disuelto es menor que 3% de saturación.

8. El procedimiento según la reivindicación 7, en el que dicho nivel de oxígeno disuelto es menor que 1% de saturación.

9. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que dichos genes de policétido sintasa se encuentran de manera natural en dichos microorganismos.

10. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que dichos genes de policétido sintasa se introducen genéticamente en dichos microorganismos.

11. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 6-10, en el que durante una fase de crecimiento inicial, el nivel de oxígeno disuelto es mayor que aproximadamente 10 por ciento y durante una fase de producción posterior el nivel de oxígeno disuelto es menor que aproximadamente 5 por ciento de saturación.

12. El procedimiento según cualquier reivindicación precedente, en el que dichos microorganismos se seleccionan del grupo que consiste en Thraustochytrium, Schizochytrium y mezclas de los mismos.

13. El procedimiento según cualquier reivindicación precedente, en el que el oxígeno disuelto en el medio de fermentación está controlado.

14. El procedimiento según cualquier reivindicación precedente, en el que el pH del medio de fermentación es de aproximadamente pH 5 a aproximadamente pH 11.

15. El procedimiento según cualquier reivindicación precedente, en el que dicho medio de fermentación o medio de cultivo está a una temperatura de al menos 20 °C.

16. El procedimiento según cualquier reivindicación precedente, en el que la velocidad de producción de lípidos promedio es de al menos 0,5 g/L/h.

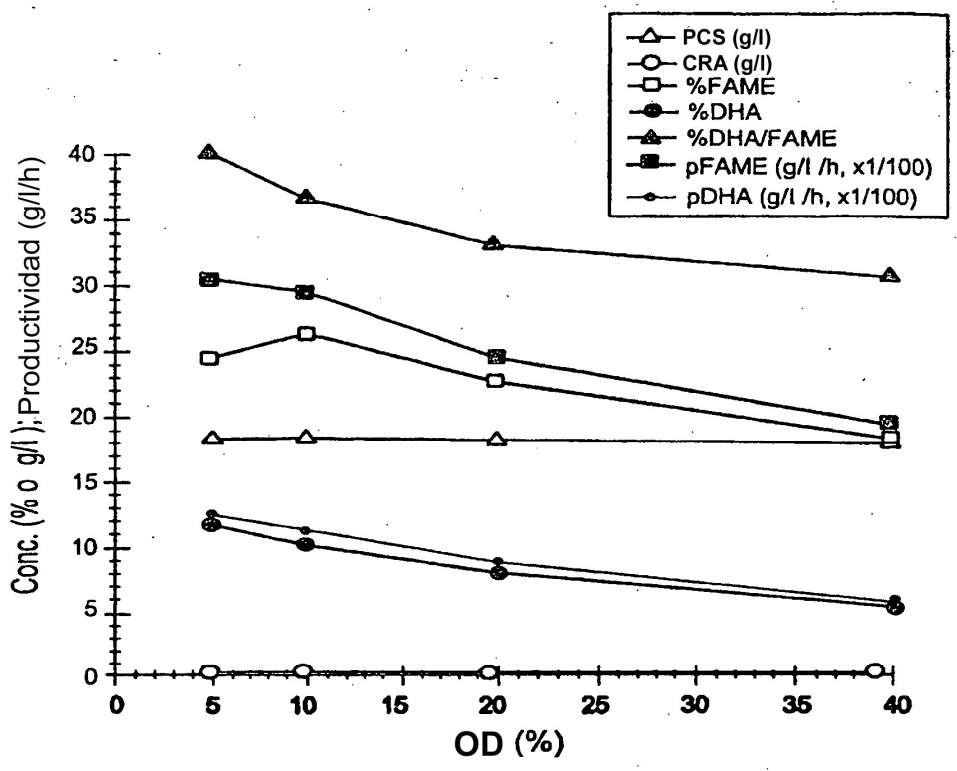
17. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en el que la velocidad de producción de DHA promedio es de al menos 0,2 g de DHA/L/h.

18. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en el que el procedimiento produce lípidos que contienen lípidos poliinsaturados en una cantidad mayor que 15%.

19. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-16 o 18, en el que al menos 20% de los lípidos producidos por los microorganismos son ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y/u omega-6.

20. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en el que el procedimiento produce lípidos que contienen al menos 25% de DHA.

21. El procedimiento según cualquier reivindicación precedente, comprendiendo dicho proceso además extraer lípidos de los microorganismos.



El Efecto de OD sobre DHA/FAME.

OD (%)	CRA (g/l)	PCS (g/l)	FAME (g/l)	DHA (g/l)	FAME (%)	DHA (%)	DHA/FAME (%)	pFAME (g/l /h)	pDHA (g/l /h)
5	0,0	18,1	5,0	2,0	24,4	11,3	40,0	0,302	0,121
10	0,0	18,3	4,9	1,8	26,3	9,6	36,7	0,292	0,107
20	0,0	18,0	4,1	1,3	22,6	7,4	33,0	0,244	0,080
40	0,0	17,8	3,2	1,0	18,2	5,6	30,6	0,191	0,059

FIG. 1