

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 002**

51 Int. Cl.:

**C11B 1/10** (2006.01)

**C11B 1/00** (2006.01)

**C12P 7/64** (2006.01)

**C12N 1/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.12.2014 PCT/IB2014/003136**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015 WO15092546**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2014 E 14871148 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2019 EP 2958982**

54 Título: **Métodos de recuperación de aceite sobre microorganismos**

30 Prioridad:

**20.12.2013 US 201361918886 P**

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

**18.03.2020**

73 Titular/es:

**MARA RENEWABLES CORPORATION (100.0%)  
101 Research Drive  
Dartmouth, Nova Scotia B2Y 4T6, CA**

72 Inventor/es:

**DENNIS, DOROTHY, A. y  
ARMENTA, ROBERTO, E.**

74 Agente/Representante:

**CONTRERAS PÉREZ, Yahel**

**Observaciones:**

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

ES 2 749 002 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Métodos de recuperación de aceite sobre microorganismos

5 **Antecedentes**

Se puede recuperar aceite de microorganismos, tales como microalgas, utilizando métodos de extracción en húmedo o métodos de extracción en seco. En los métodos de extracción en seco, los microorganismos se recogen y secan normalmente antes de la extracción de aceite. Sin embargo, el secado es un proceso costoso y de gran consumo de energía. Asimismo, si el aceite es rico en ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) (p. ej., para aplicaciones de complementos alimenticios y nutricionales), el proceso puede causar oxidaciones significativas del AGPI debido a las temperaturas elevadas implicadas en el secado.

Además, los métodos de extracción en seco de recuperación de aceite de microorganismos se realizan normalmente con disolventes orgánicos, tales como hexanos, y requieren acoplamiento con métodos de rotura celular mecánica para obtener rendimientos de aceite adecuados. Sin embargo, los métodos de rotura mecánica son caros y de gran consumo de energía, mientras que los disolventes orgánicos son inflamables, tóxicos y se han de retirar del producto de aceite final.

El documento WO 02/10423 A2 desvela los métodos de extracción de aceite de células microbianas. Después de la lisis celular, el aceite se separa de los restos celulares formando una capa superior que comprende aceite y una capa inferior que comprende restos de la pared celular. Se desvela que los lípidos están separados de los restos celulares.

El documento CA 2 801 011 A1 desvela varios métodos de tratamiento de una composición celular lisada y expone que la composición celular tratada o la composición celular lisada tratada pueden colocarse en una centrifuga y un lípido puede separarse de ella. En un ejemplo, que describe la extracción enzimática sin hidrólisis de base, las composiciones celulares lisadas se centrifugan para formar tres fases: una fase superior que contiene un lípido, una fase intermedia que contiene una emulsión y una fase inferior que contiene una emulsión sólido/líquido.

El documento WO 03/092628 A2 desvela métodos para recuperar lípidos de una biomasa. Se sugiere que el uso de enzimas solas para la rotura celular no resulta en rotura celular o lisis celular. Se propone añadir un tensioactivo durante la lisis celular, añadir presión o utilizar un disolvente para extraer aceite de las células microbianas

35 **Sumario**

En la presente memoria se proporcionan métodos en húmedo, sin disolventes, para recuperar aceite (es decir, lípidos) de microorganismos como se define en las reivindicaciones. Los métodos son útiles, por ejemplo, para obtener aceites nutricionales y/o biocombustibles lipídicos. Los métodos de recuperación de aceite descritos en la presente memoria se pueden realizar opcionalmente como un bioproceso integrado, es decir, como un método de "una sola etapa".

Los métodos de recuperación de lípidos de una población de microorganismos descritos en la presente memoria comprenden poner en contacto la población de microorganismos con una o más enzimas en condiciones que causan la alteración de los microorganismos, en los que la etapa de puesta en contacto se realiza en presencia de 0,001 % y 0,4 % de enzima en volumen/volumen durante una a veinte horas a una temperatura de 50 °C a 70 °C; concentrar los microorganismos alterados con los lípidos al producir una capa pesada y una capa ligera y separar la capa pesada que comprende esencialmente la totalidad de los microorganismos alterados en forma de lípidos y biomasa gastada; y extraer los lípidos de los microorganismos alterados a una temperatura alta de 55 °C a 95 °C en presencia de una sal y en ausencia de disolventes orgánicos, en los que la ausencia de un medio de disolvente orgánico inferior a aproximadamente 0,5 % de disolvente basado en el peso de los microorganismos alterados, en los que la extracción separa los lípidos de los microorganismos. Opcionalmente, la etapa de contacto se puede realizar a un pH entre e inclusive a 5 y 8,5 (p. ej., aproximadamente 8). La etapa de contacto se realiza a una temperatura entre e inclusive a aproximadamente 50 °C y 70 °C. La etapa de contacto se realiza durante una a veinte horas, inclusive (p. ej., de una a ocho horas o durante cuatro horas).

Opcionalmente, la enzima utilizada en la etapa de contacto es una proteasa. La enzima es opcionalmente Alcalase 2,4 l. La enzima se encuentra a una concentración de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 0,4 % volumen/volumen (inclusive) (p. ej., entre 0,05 y 0,2, o aproximadamente 0,05, 0,1, o 0,2 %). La etapa de contacto se puede realizar opcionalmente en presencia de entre 0,05 y 0,2 % (inclusive) de enzima durante e incluyendo una a ocho horas a 55 °C. Por ejemplo, la etapa de contacto se puede realizar en presencia de enzima al 0,1 % durante cuatro horas a 55 °C. Opcionalmente, la etapa de contacto se realiza en presencia de enzima al 0,05 % durante seis horas a 55 °C. El pH se puede titular a un pH de aproximadamente 8,0 durante la etapa de contacto.

Opcionalmente, la etapa de contacto puede incluir la mezcla que se produce por aireación o por recirculación.

Opcionalmente, la mezcla no se produce por agitación.

La etapa de contacto puede realizarse en ausencia de tensioactivos. Opcionalmente, la población de microorganismos no se concentra antes de la etapa de contacto. El método puede comprender además una etapa de pretratamiento, en la que la etapa de pretratamiento incluye la ruptura de las células antes de la etapa de contacto. La etapa de pretratamiento puede realizarse utilizando un método de rotura celular química, mecánica o enzimática.

La etapa de concentración comprende opcionalmente centrifugación. Opcionalmente, la etapa de concentración comprende 25 % a 95 % de eliminación acuosa, inclusive (p. ej., 50 % a 95 % u 85 % de eliminación acuosa).

La temperatura elevada durante la etapa de extracción se encuentra en el intervalo de 55 °C a 95 °C (p. ej., 75 a 95 u 85 °C o 90 °C). Opcionalmente, la concentración de sal añadida durante la etapa de extracción es e incluye de 1 % a 5 % o de 3 % a 5 % (p. ej., 3 % o 5 %). La sal en la etapa de extracción puede ser sulfato de sodio. Al menos el 80 % de los lípidos se puede extraer de los microorganismos alterados.

Opcionalmente, los métodos de extracción de lípidos de una población de microorganismos descritos en la presente memoria carecen de una etapa de pasteurización. Opcionalmente, los métodos de extracción de lípidos de una población de microorganismos descritos en la presente memoria carecen de una etapa de secado.

La población de microorganismos se puede seleccionar entre el grupo que consiste en algas, hongos, bacterias y protistas. Opcionalmente, la población de microorganismos se selecciona entre el género *Thraustochytrium*, *Schizochytrium* o mezclas de los mismos. Opcionalmente, la población de microorganismos es una *Thraustochytrium* sp., Por ejemplo, depositada con el número de acceso ATCC PTA-6245.

Los detalles de una o más realizaciones se exponen en los dibujos y la descripción a continuación. Otras características, objetos y ventajas resultarán evidentes a partir de la descripción, los dibujos, y a partir de las reivindicaciones.

### 30 Descripción de los dibujos

La figura 1 es un gráfico que muestra el porcentaje de aceite recuperado de células hidrolizadas con 40 mM (barra izquierda), 100 mM (barra central) y 160 mM (barra derecha) de ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, hidróxido de sodio e hidróxido de potasio.

La figura 2 es un gráfico que muestra el porcentaje de aceite recuperado de células enzimáticamente hidrolizadas con 0,2 % (barra izquierda) y 0,4 % (barra derecha) de enzimas Viscozyme, Alcalase, Flavourzyme y Mannaway.

La figura 3 es un gráfico que muestra el porcentaje de aceite recuperado de células no lavadas (barra izquierda) y lavadas (barra derecha) después de la hidrólisis con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 40 mM, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 160 mM y Alcalase al 0,2 % (v/v).

La figura 4 es un gráfico que muestra el porcentaje de aceite recuperado de células enzimáticamente hidrolizadas a 55 °C durante 18 horas y a 70 °C durante 4 horas.

La figura 5 es un gráfico que muestra el perfil de la clase de lípidos de aceite de algas TG, biocombustibles y aceite de algas EE.

La figura 6 es una representación (de izquierda a derecha) de la alimentación de biomasa hidrolizada con Alcalase al 0,4 % (v/v) a 55 °C durante 18 horas, biomasa hidrolizada concentrada después de la centrifugación a 55 °C y medios después de la centrifugación a 55 °C.

La figura 7A es una representación de alimentación de biomasa hidrolizada concentrada tratada con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 90 °C de calor.

La figura 7B es una fotografía que muestra (izquierda) la biomasa consumida después de la centrifugación a 90 °C y (derecha) el aceite recuperado después de la centrifugación a 90 °C.

La figura 8 es un gráfico que muestra el porcentaje de aceite recuperado de células y la concentración de aminoácidos en el medio después de la hidrólisis enzimática con Alcalase al 0,1 % (v/v) a 55 °C y pH 8,0 en función del tiempo de hidrólisis.

La figura 9 es un gráfico que muestra el porcentaje de aceite recuperado de células y la concentración de aminoácidos en el medio después de la hidrólisis enzimática con Alcalase al 0,05 % (v/v) a 55 °C y pH 8,0 en función del tiempo de hidrólisis.

65

La figura 10 es un gráfico que muestra el porcentaje de aceite recuperado de células enzimáticamente hidrolizadas a un pH de 3,5, 4,5, 5,5, 6,5, 7,5 y 8,0.

### Descripción detallada

5 En la presente memoria se describen métodos en húmedo y sin disolventes para recuperar lípidos de una población de microorganismos. Los métodos de recuperación de lípidos incluyen poner en contacto la población de microorganismos con una o más enzimas en condiciones que provocan la alteración de los microorganismos, concentrar los microorganismos alterados y extraer lípidos de los microorganismos alterados. La rotura celular es  
10 húmeda. La extracción se realiza a una temperatura elevada, en presencia de una sal y en ausencia de disolventes. Los métodos descritos en la presente memoria pueden denominarse procesos de "una sola etapa" o "integrados" dado que la producción de aceite microbiano y la rotura celular para liberar el aceite se pueden realizar opcionalmente en el mismo recipiente. Por lo tanto, las etapas de procesamiento aguas abajo (p. ej., extracción y recuperación de aceite) se pueden integrar al final de las etapas de procesamiento aguas arriba (p. ej.,  
15 fermentación).

### I. Microorganismos

Los métodos descritos en la presente memoria incluyen la recuperación de lípidos de una población de  
20 microorganismos. La población de microorganismos descrita en la presente memoria puede ser algas (p. ej., microalgas), hongos (incluida levadura), bacterias o protistas. Opcionalmente, el microorganismo incluye *Thraustochytrids* del orden *Thraustochytriales*, más específicamente *Thraustochytriales* del género *Thraustochytrium* y *Schizochytrium*. Opcionalmente, la población de microorganismos incluye *Thraustochytriales* como se describe en las patentes de EE.UU. n.º 5.340.594 y 5.340.742. El microorganismo puede ser una especie *Thraustochytrium*,  
25 como la especie *Thraustochytrium* depositada con el número de acceso ATCC PTA-6245 (es decir, ONC-T18).

Los microorganismos para su uso en los métodos descritos en la presente memoria pueden producir una variedad de compuestos lipídicos. Como se utiliza en la presente memoria, el término lípido incluye fosfolípidos, ácidos grasos libres, ésteres de ácidos grasos, triacilglicérols, esteroides y ésteres de esterol, carotenoides, xantófilos (p. ej.,  
30 oxicarotenoides), hidrocarburos y otros lípidos conocidos por un experto en la materia.

Opcionalmente, los compuestos lipídicos incluyen ácidos grasos saturados, monoinsaturados y/o poliinsaturados.

Opcionalmente, los compuestos lipídicos incluyen lípidos insaturados. Los lípidos insaturados pueden incluir lípidos  
35 poliinsaturados (es decir, lípidos que contienen al menos 2 enlaces carbono-carbono insaturados, p. ej., enlaces dobles) o lípidos altamente insaturados (es decir, lípidos que contienen 4 o más enlaces carbono-carbono insaturados). Los ejemplos de lípidos insaturados incluyen ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y/u omega-6, como ácido docosahexaenoico (es decir, ADH), ácido eicosapentaenoico (es decir, AEP) y otros compuestos insaturados y poliinsaturados de origen natural.

40

### II Proceso

#### Fermentación

45 Los microorganismos descritos en la presente memoria pueden cultivarse según los métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un traustocítrido, p. ej., una *Thraustochytrium sp.*, se puede cultivar según los métodos descritos en las publicaciones de patente de EE. UU. US 2009/0117194 o US 2012/0244584. Los microorganismos se cultivan en un medio de crecimiento (también conocido como "medio de cultivo"). Cualquiera de una variedad de medios puede ser adecuado para su uso en el cultivo de los microorganismos descritos en la presente memoria.  
50 Opcionalmente, el medio suministra varios componentes nutricionales, incluida una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno, para el microorganismo.

Opcionalmente, los microorganismos proporcionados en la presente memoria se cultivan en condiciones que aumentan la biomasa y/o la producción de un compuesto de interés (p. ej., contenido de aceite o ácidos grasos  
55 totales (AGT)). Los traustocítridos, por ejemplo, se cultivan normalmente en medios salinos. Opcionalmente, los traustocítridos pueden cultivarse en un medio que tenga una concentración de sal de aproximadamente 2,0 g/l a aproximadamente 50,0 g/l. Opcionalmente, los traustocítridos se cultivan en medios que tienen una concentración de sal de aproximadamente 2 g/l a aproximadamente 35 g/l (p. ej., de aproximadamente 18 g/l a aproximadamente 35 g/l). Opcionalmente, los traustocítridos descritos en la presente memoria pueden cultivarse en condiciones con un  
60 contenido bajo en sal. Por ejemplo, los traustocítridos se pueden cultivar en un medio que tiene una concentración de sal de aproximadamente 5 g/l a aproximadamente 20 g/l (p. ej., de aproximadamente 5 g/l a aproximadamente 15 g/l). Los medios de cultivo incluyen opcionalmente NaCl. Opcionalmente, los medios incluyen sal marina natural o artificial y/o agua de mar artificial.

65 La concentración de cloruro en los medios de cultivo se puede reducir (es decir, una cantidad menor) en

comparación con los métodos tradicionales. Los medios de cultivo pueden incluir sales de sodio que no contienen cloruro (p. ej., sulfato de sodio) como fuente de sodio. Por ejemplo, una porción significativa del sodio total puede ser suministrada por sales sin cloruro de manera que menos de aproximadamente 100 %, 75 %, 50 % o 25 % del sodio total en los medios de cultivo es suministrada por cloruro de sodio.

5

Opcionalmente, los medios de cultivo tienen concentraciones de cloruro inferiores a aproximadamente 3 g/l, 500 mg/l, 250 mg/l, o 120 mg/l. Por ejemplo, los medios de cultivo tienen concentraciones de cloruro de entre e inclusive aproximadamente 60 mg/l y 120 mg/l. Los ejemplos de sales de sodio sin cloruro adecuadas para su uso según los presentes métodos incluyen, entre otros, ceniza de 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. Véase, p. ej., las patentes de EE.UU. n.º 5.340.742 y 6.607.900.

Los medios para el cultivo de traustocítridos pueden incluir cualquiera de una variedad de fuentes de carbono. Ejemplos de fuentes de carbono incluyen ácidos grasos; lípidos, glicerol; triglicéridos; carbohidratos como glucosa, almidón, celulosas, hemicelulosas, fructosa, dextrosa, xilosa, lactulosa, galactosa, maltotriosa, maltosa, lactosa, glicógeno, gelatina, almidón (maíz o trigo), acetato, m-inositol (derivado del licor de maíz macerado), ácido galacturónico (derivado de la pectina), L-fucosa (derivado de la galactosa), gentiobiosa, glucosamina, alfa-D-glucosa-1-fosfato (derivado de la glucosa), celobiosa, dextrina y alfa-ciclodextrina (derivado del almidón); sacarosa (de melazas); polioles tales como maltitol, eritritol, adonitol y ácidos oleicos tales como glicerol y tween 80; aminoazúcares tales como N-acetil-D-galactosamina, N-acetil-D-glucosamina y N-acetil-beta-D-manosamina; y cualquier tipo de biomasa o corriente de residuos.

Opcionalmente, los medios incluyen fuentes de carbono en una concentración de aproximadamente 5 g/l a aproximadamente 200 g/l. Los medios pueden tener una relación C:N (carbono a nitrógeno) entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 40:1. Cuando se utilizan cultivos bifásicos, los medios pueden tener una relación C:N de entre e inclusive aproximadamente 1:1 a aproximadamente 5:1 para la primera fase, luego aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:0 (es decir, una cantidad nula o mínima de nitrógeno) en la segunda fase. Como se utiliza en la presente memoria, el término mínimo se refiere a menos de aproximadamente 10 % (p. ej., menos de aproximadamente 9 %, menos de aproximadamente 8 %, menos de aproximadamente 7 %, menos de aproximadamente 6 %, menos de aproximadamente 5 %, menos de aproximadamente 4 %, menos de aproximadamente 3 %, menos de aproximadamente 2 %, menos de aproximadamente 1 %, menos de aproximadamente 0,9 %, menos de aproximadamente 0,8 %, menos de aproximadamente 0,7 %, menos de aproximadamente 0,6 %, menos de aproximadamente 0,5 %, menos de aproximadamente 0,4 %, menos de aproximadamente 0,3 %, menos de aproximadamente 0,2 % o menos de aproximadamente 0,1 %). Por ejemplo, el nitrógeno mínimo en los medios puede referirse a menos de aproximadamente 10 % (p. ej., menos de aproximadamente 9 %, menos de aproximadamente 8 %, menos de aproximadamente 7 %, menos de aproximadamente 6 %, menos de aproximadamente 5 %, menos de aproximadamente 4 %, menos de aproximadamente 3 %, menos de aproximadamente 2 %, menos de aproximadamente 1 %, menos de aproximadamente 0,9 %, menos de aproximadamente 0,8 %, menos de aproximadamente 0,7 %, menos de aproximadamente 0,6 %, menos de aproximadamente 0,5 %, menos de aproximadamente 0,4 %, menos de aproximadamente 0,3 %, menos de aproximadamente 0,2 %, o menos de aproximadamente 0,1 %) de nitrógeno en los medios.

Los medios para el cultivo de traustocítridos pueden incluir cualquiera de una variedad de fuentes de nitrógeno. Ejemplos de fuentes de nitrógeno incluyen soluciones de amonio (p. ej.,  $\text{NH}_4$  en  $\text{H}_2\text{O}$ ), sales de amonio o amina (p. ej.,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{OOCCH}_2\text{CH}_3$  ( $\text{NH}_4\text{Ac}$ )), peptona, triptona, extracto de levadura, extracto de malta, harina de pescado, glutamato de sodio, extracto de soja, casaminoácidos y granos destiladores. Las concentraciones de fuentes de nitrógeno en medios adecuados normalmente varían entre e incluyen aproximadamente 1 g/l y aproximadamente 25 g/l.

50

Los medios incluyen opcionalmente un fosfato, tal como fosfato de potasio o fosfato de sodio. Las sales inorgánicas y las sustancias oligonutritivas en los medios pueden incluir sulfato de amonio, bicarbonato de sodio, ortovanadato de sodio, cromato de potasio, molibdato de sodio, ácido selenoso, sulfato de níquel, sulfato de cobre, sulfato de zinc, cloruro de cobalto, cloruro de hierro, cloruro de manganeso, cloruro de calcio y EDTA. Pueden incluirse vitaminas como clorhidrato de piridoxina, clorhidrato de tiamina, pantotenato de calcio, ácido p-aminobenzoico, riboflavina, ácido nicotínico, biotina, ácido fólico y vitamina B12.

El pH del medio se puede ajustar en entre e inclusive 3,0 y 10,0, utilizando ácido o base, cuando sea apropiado, y/o utilizando la fuente de nitrógeno. Opcionalmente, el medio se ajusta a un pH de 4,0 a 6,5, inclusive. El medio puede ser esterilizado.

60

Generalmente, un medio utilizado para el cultivo de un microorganismo es un medio líquido. Sin embargo, el medio utilizado para el cultivo de un microorganismo puede ser un medio sólido. Además de las fuentes de carbono y nitrógeno como se discute en la presente memoria, un medio sólido puede contener uno o más componentes (p. ej., agar o agarosa) que proporcionan soporte estructural y/o permiten que el medio esté en forma sólida.

65

Las células se pueden cultivar entre 1 día y 60 días. Opcionalmente, el cultivo se lleva a cabo durante 14 días o menos, 13 días o menos, 12 días o menos, 11 días o menos, 10 días o menos, 9 días o menos, 8 días o menos, 7 días o menos, 6 días o menos, 5 días o menos, 4 días o menos, 3 días o menos, 2 días o menos, o 1 día o menos.

El cultivo se realiza opcionalmente a temperaturas de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 30 °C, p. ej., de aproximadamente 18 °C a aproximadamente 28 °C. El cultivo puede incluir un cultivo de aireación-agitación, cultivo de agitación, cultivo estacionario, cultivo discontinuo, cultivo semicontinuo, cultivo continuo, cultivo discontinuo repetido, cultivo en tandas o similares. El cultivo puede realizarse utilizando un fermentador de agitación convencional, un fermentador en columna de burbujas (cultivos discontinuos o continuos), un fermentador en tandas, etc.

10

Los cultivos se pueden airear mediante uno o más diversos métodos, incluyendo agitación. Opcionalmente, la agitación varía de aproximadamente 100 rpm a aproximadamente 1000 rpm, p. ej., de aproximadamente 350 rpm a aproximadamente 600 rpm o de aproximadamente 100 a aproximadamente 450 rpm. Opcionalmente, los cultivos se airean utilizando diferentes velocidades de agitación durante las fases de producción de biomasa y durante las fases productoras de lípidos. Alternativa o adicionalmente, las velocidades de agitación pueden variar dependiendo del tipo de recipiente de cultivo (p. ej., forma o tamaño del matraz).

15

Opcionalmente, el nivel de oxígeno disuelto (OD) es mayor durante la fase de producción de biomasa que durante la fase de producción de lípidos. Por lo tanto, los niveles de OD se reducen durante la fase de producción de lípidos (es decir, los niveles de DO son inferiores la cantidad de oxígeno disuelto en la fase de producción de biomasa). Opcionalmente, el nivel de oxígeno disuelto se reduce por debajo de la saturación. Por ejemplo, el nivel de oxígeno disuelto se puede reducir a un nivel muy bajo, o incluso indetectable.

20

La producción de lípidos deseables puede potenciarse cultivando células según métodos que implican un cambio de una o más condiciones de cultivo para obtener mayores cantidades de compuestos deseables. Opcionalmente, las células se cultivan primero en condiciones que maximizan la biomasa, seguido de un cambio de una o más condiciones de cultivo a condiciones que favorecen la productividad de los lípidos. Las condiciones que se cambian pueden incluir la concentración de oxígeno, la relación C:N, la temperatura y combinaciones de los mismos. Opcionalmente, se realiza un cultivo en dos etapas en el que una primera etapa favorece la producción de biomasa (p. ej., utilizando condiciones de oxígeno elevado (p. ej., generalmente o en relación con la segunda etapa), baja relación C:N y temperatura ambiente), seguido de una segunda etapa que favorece la producción de lípidos (p. ej., en la que disminuye el oxígeno, aumenta la relación C:N y disminuye la temperatura).

25

30

#### *Pasteurización*

35

Opcionalmente, la biomasa resultante se pasteuriza para destruir las células e inactivar las sustancias indeseables presentes en la biomasa. Por ejemplo, la biomasa se puede pasteurizar para inactivar sustancias que degradan compuestos. La biomasa puede estar presente en los medios de fermentación o aislada de los medios de fermentación para la etapa de pasteurización. La etapa de pasteurización se puede realizar calentando la biomasa y/o los medios de fermentación a una temperatura elevada. Por ejemplo, la biomasa y/o los medios de fermentación se pueden calentar a una temperatura de aproximadamente 55 °C inclusive a aproximadamente 121 °C inclusive (p. ej., de aproximadamente 55 °C inclusive a aproximadamente 90 °C inclusive) o desde aproximadamente 65 °C inclusive hasta aproximadamente 80 °C inclusive). Opcionalmente, la biomasa y/o los medios de fermentación pueden calentarse desde aproximadamente 4 minutos inclusive hasta aproximadamente 120 minutos inclusive (p. ej., desde aproximadamente 30 minutos inclusive hasta aproximadamente 120 minutos inclusive, o desde aproximadamente 45 minutos inclusive hasta aproximadamente 90 minutos inclusive, o desde aproximadamente 55 minutos inclusive hasta aproximadamente 75 minutos inclusive). La pasteurización se puede realizar utilizando un medio de calentamiento adecuado como los que conocen los expertos en la materia, tal como por inyección directa de vapor.

40

45

Opcionalmente, no se realiza una etapa de pasteurización (es decir, el método carece de una etapa de pasteurización).

50

#### *Recogida y lavado*

55

Opcionalmente, la biomasa se puede recoger según métodos conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, la biomasa se puede recoger opcionalmente de los medios de fermentación utilizando varios métodos convencionales, tales como centrifugación (p. ej., centrifugas de expulsión de sólidos) o filtración (p. ej., filtración de flujo cruzado) y también pueden incluir el uso de un agente de precipitación para la recogida acelerada de biomasa celular (p. ej., fosfato de sodio o cloruro de calcio).

60

Opcionalmente, la biomasa se lava con agua. Opcionalmente, la biomasa se puede concentrar hasta aproximadamente 30 % de sólidos, inclusive. Por ejemplo, la biomasa se puede concentrar hasta aproximadamente 5 %, inclusive hasta aproximadamente 30 % de sólidos, inclusive, desde aproximadamente 7,5 %, inclusive hasta aproximadamente 15 % de sólidos, inclusive, o desde aproximadamente 15 % de sólidos, inclusive hasta

65

aproximadamente 20 % de sólidos, inclusive, o cualquier porcentaje dentro de los intervalos indicados. Opcionalmente, la biomasa se puede concentrar a aproximadamente 30 % de sólidos o menos, aproximadamente 29 % de sólidos o menos, aproximadamente 28 % de sólidos o menos, aproximadamente 27 % de sólidos o menos, aproximadamente 26 % de sólidos o menos, aproximadamente 25 % de sólidos o menos, aproximadamente 24 %  
 5 de sólidos o menos, aproximadamente 23 % de sólidos o menos, aproximadamente 22 % de sólidos o menos, aproximadamente 21 % de sólidos o menos, aproximadamente 20 % de sólidos o menos, aproximadamente 19 % de sólidos o menos, aproximadamente 18 % de sólidos o menos, aproximadamente 17 % de sólidos o menos, aproximadamente 16 % de sólidos o menos, aproximadamente 15 % de sólidos o menos, aproximadamente 14 %  
 10 de sólidos o menos, aproximadamente 13 % de sólidos o menos, aproximadamente 12 % de sólidos o menos, aproximadamente 11 % de sólidos o menos, aproximadamente 10 % de sólidos o menos, aproximadamente 9 % de sólidos o menos, aproximadamente 8 % de sólidos o menos, aproximadamente 7 % de sólidos o menos, aproximadamente 6 % de sólidos o menos, aproximadamente 5 % de sólidos o menos, aproximadamente 4 % de sólidos o menos, aproximadamente 3 % sólidos o menos, aproximadamente 2 % de sólidos o menos, o  
 15 aproximadamente 1 % de sólidos o menos.

#### *Hidrólisis*

La hidrólisis celular (es decir, rotura celular) se puede realizar utilizando métodos químicos, enzimáticos y/o mecánicos. Opcionalmente, el método descrito en la presente memoria carece de una etapa de secado. Por  
 20 ejemplo, la biomasa opcionalmente no se seca antes de la hidrólisis celular. Opcionalmente, la biomasa no se concentra después de que se complete la fermentación y antes de la etapa de contacto.

Los métodos químicos para hidrolizar las células pueden incluir la adición de ácido a las células, lo que se denomina en la presente memoria como hidrólisis ácida. En el método de hidrólisis ácida, la biomasa puede lavarse con agua  
 25 utilizando, por ejemplo, centrifugación, y concentrarse como se ha descrito anteriormente antes de hidrolizar las células. Opcionalmente, la biomasa se concentra hasta aproximadamente 15 % de sólidos con agua.

Luego se añade ácido a la biomasa húmeda lavada. Opcionalmente, la biomasa no se seca antes de añadir el ácido. Los ácidos adecuados para su uso en la etapa de hidrólisis ácida incluyen ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido  
 30 fosfórico, ácido bromhídrico, ácido nítrico, ácido perclórico y otros ácidos fuertes conocidos por los expertos en la materia. Se puede añadir una cantidad adecuada de ácido a la biomasa húmeda lavada para lograr una concentración final de aproximadamente e incluyendo 100 mM a aproximadamente e incluyendo 200 mM (p. ej., de aproximadamente e incluyendo 120 mM a aproximadamente e incluyendo 180 mM o de aproximadamente e incluyendo 140 mM a aproximadamente e incluyendo 160 mM). Se puede añadir ácido sulfúrico a la biomasa  
 35 húmeda lavada hasta una concentración final de 160 mM.

La mezcla resultante que incluye agua, biomasa y ácido se puede incubar durante un periodo de tiempo para hidrolizar las células. Opcionalmente, la mezcla se puede incubar a una temperatura de aproximadamente 30 °C  
 40 inclusive a aproximadamente 200 °C inclusive. Por ejemplo, la mezcla se puede incubar a una temperatura de aproximadamente 45 °C inclusive a aproximadamente 180 °C inclusive, desde aproximadamente 60 °C inclusive hasta aproximadamente 150 °C inclusive, o desde aproximadamente 80 °C inclusive hasta aproximadamente 130 °C inclusive. Opcionalmente, la mezcla se incuba en un autoclave a una temperatura de 121 °C. La mezcla se puede  
 45 incubar durante un periodo de tiempo adecuado para hidrolizar al menos 50 % de las células (p. ej., al menos 60 % de las células, al menos 70 % de las células, al menos 80 % de las células, al menos 90 % de las células, al menos 95 % de las células o 100 % de las células). El periodo de tiempo para incubar las células depende de la temperatura de incubación. La incubación de la mezcla a una temperatura más alta puede hacer que la hidrólisis proceda a una velocidad más rápida (es decir, que requiera un periodo de tiempo más corto para la hidrólisis). En algunos ejemplos, las células pueden incubarse a 60 °C durante 1 hora.

50 Como se ha descrito anteriormente, la hidrólisis celular (es decir, rotura celular) se puede realizar utilizando métodos enzimáticos. Específicamente, la población de microorganismos puede ponerse en contacto con una o más enzimas en condiciones que causen la alteración de los microorganismos. Opcionalmente, la enzima es una proteasa. Un ejemplo de una proteasa adecuada es ALCALASE 2,4 I FG (Novozymes; Franklinton, Carolina del Norte). Opcionalmente, las células no se lavan con agua antes de la hidrólisis enzimática. Opcionalmente, la población de  
 55 microorganismos no se concentra antes de la hidrólisis enzimática.

Antes de poner en contacto los microorganismos con una o más enzimas, el pH de los medios de fermentación puede ajustarse opcionalmente de aproximadamente 5 a 8,5 inclusive, p. ej., de aproximadamente 5,5 a 8,0  
 60 inclusive o de aproximadamente 6,5 a 7,5 inclusive, o cualquier valor dentro de los intervalos indicados. Por ejemplo, el pH de los medios de fermentación se puede ajustar opcionalmente a 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4 u 8,5. El pH se puede ajustar utilizando, por ejemplo, una base tal como hidróxido de sodio (p. ej., NaOH 1 N), hidróxido de amonio, hidróxido de calcio, hidróxido de magnesio o hidróxido de potasio. El pH de los medios de fermentación también se puede ajustar durante la etapa de contacto. Opcionalmente, el pH se ajusta a aproximadamente un pH  
 65 de 8,0 antes o durante la etapa de contacto.

Los microorganismos se ponen en contacto con una o más enzimas mientras la población de microorganismos está en el medio de fermentación (es decir, la etapa de contacto ocurre en el medio de fermentación). Opcionalmente, el medio de fermentación se concentra después de la fermentación y antes de la etapa de contacto. Opcionalmente, el medio de fermentación se diluye después de la fermentación y antes de la etapa de contacto. La enzima añadida al medio de fermentación está en una concentración de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 0,4 % volumen/volumen (v/v). Por ejemplo, la enzima añadida al medio de fermentación puede estar en una concentración de 0,05 % (v/v) a 0,4 % (v/v), 0,05 % a 0,2 % (v/v), o de 0,1 % a 0,2 % (v/v). En algunos ejemplos, la enzima añadida al medio de fermentación está en una concentración de 0,05 % (v/v), 0,1 % (v/v), 0,15 % (v/v), 0,2 % (v/v), 0,25 % (v/v), 0,30 % (v/v), 0,35 % (v/v) o 0,4 % (v/v).

10

La etapa de contacto se realiza a una temperatura de aproximadamente 50 °C inclusive hasta aproximadamente 70 °C inclusive, desde aproximadamente 55 °C inclusive hasta aproximadamente 70 °C inclusive, o hasta 55 °C. La etapa de contacto se realiza durante un periodo de tiempo adecuado para dar como resultado la alteración de los microorganismos. La etapa de contacto se realiza desde aproximadamente 1 hora inclusive hasta aproximadamente 20 horas inclusive, p. ej., de 1 hora a 18 horas, de 1 hora a 6 horas, de 4 horas a 6 horas, o cualquier periodo de tiempo dentro de los intervalos indicados. Opcionalmente, la etapa de contacto puede realizarse durante aproximadamente 4 horas.

15

La temperatura óptima, el tiempo, el pH y la concentración de la enzima dependen de la enzima específica, y un experto en la materia podría modificar la temperatura, el tiempo, el pH y la concentración de la enzima según corresponda para una enzima dada.

20

Opcionalmente, la etapa de contacto se realiza en presencia de aproximadamente 0,05 % (v/v) o aproximadamente 0,2 % (v/v) de enzima durante aproximadamente 1 a 6 horas a aproximadamente 55 °C. Por ejemplo, la etapa de contacto puede ser realizada en presencia de 0,1 % (v/v) de enzima durante cuatro horas a 55 °C. Opcionalmente, la etapa de contacto se realiza en ausencia de tensioactivos (es decir, no hay tensioactivo presente).

25

El método puede comprender además una etapa de pretratamiento, en la que la etapa de pretratamiento incluye la ruptura de las células antes de la etapa de contacto. La etapa de pretratamiento puede realizarse utilizando un método de rotura celular química, mecánica o enzimática. En otras palabras, la rotura celular puede realizarse utilizando una combinación de dos o más de los métodos químicos, enzimáticos y/o mecánicos descritos en la presente memoria (p. ej., hidrólisis enzimática en combinación con molienda de microesferas). Los métodos de rotura celular pueden realizarse secuencialmente (p. ej., molienda de microesferas seguida de hidrólisis enzimática). Opcionalmente, se puede realizar un método químico o mecánico como una primera etapa de hidrólisis seguido de una rotura celular enzimática como una segunda etapa de hidrólisis. En estos ejemplos, se puede utilizar una cantidad menor de enzima en la etapa de rotura celular enzimática en comparación con la cantidad de enzima utilizada cuando solo se realiza un único método de rotura celular.

30

35

#### *Concentración*

40

Los microorganismos alterados que resultan de la hidrólisis enzimática se pueden concentrar separando y eliminando los medios de fermentación y proporcionar la concentración deseada de los microorganismos alterados para etapas posteriores. Opcionalmente, los microorganismos alterados se concentran por centrifugación y eliminación de una o más sustancias para proporcionar la concentración deseada. Cuando se utiliza la centrifugación, opcionalmente, la centrifugación puede proporcionar dos o más capas que incluyen una capa pesada y una capa ligera. La capa pesada incluye componentes de medios de fermentación solubles y agua y la capa ligera incluye los microorganismos alterados en forma de lípidos y biomasa consumida. La capa ligera puede incluir además algo de agua. La capa ligera puede incluir al menos una porción de los lípidos y biomasa y agua en forma de una emulsión.

50

La etapa de concentración incluye eliminar una o más sustancias presentes en la etapa de contacto. Por ejemplo, la etapa de concentración puede incluir la eliminación acuosa. Opcionalmente, la etapa de concentración incluye desde aproximadamente 25 % inclusive hasta aproximadamente 95 % inclusive de eliminación acuosa (p. ej., aproximadamente 85 % de eliminación acuosa), en volumen. Opcionalmente, la etapa de concentración incluye eliminar al menos una porción de la capa pesada, por ejemplo, drenando la capa pesada a través de una válvula o aspirando o decantando la capa pesada.

55

Opcionalmente, los microorganismos alterados concentrados se pueden dejar reposar durante un periodo de tiempo antes de recuperar el aceite de los microorganismos alterados según la etapa de extracción que se describe a continuación. Los microorganismos alterados concentrados se pueden dejar reposar hasta 24 horas (p. ej., 1 hora, 2 horas, 5 horas, 10 horas, 15 horas, 20 horas o 24 horas).

60

#### *Extracción*

Como se ha descrito anteriormente, los lípidos se extraen de los microorganismos alterados a una temperatura alta

65

en presencia de una sal y en ausencia de disolventes orgánicos.

La etapa de extracción se realiza a alta temperatura. Como se utiliza en la presente memoria, temperatura alta se refiere a una temperatura de al menos aproximadamente 55 °C (p. ej., una temperatura de aproximadamente 55 °C  
5 inclusive a aproximadamente 95 °C inclusive). Por ejemplo, la mezcla de lípidos y biomasa puede ponerse en contacto con una sal, un aceite o un biocombustible a una temperatura de aproximadamente 65 °C o superior, aproximadamente 70 °C o superior, aproximadamente 75 °C o superior, aproximadamente 80 °C o superior, aproximadamente 85 °C o superior, aproximadamente 90 °C o superior, o aproximadamente 95 °C o superior.

10 La etapa de extracción se realiza en presencia de una sal. La sal puede ser, por ejemplo, sulfato de sodio. La concentración de la sal añadida durante la etapa de extracción puede ser de aproximadamente 1 % inclusive a aproximadamente 5 % inclusive (v/v) basado en el volumen de la mezcla de extracción (p. ej., de aproximadamente 3 % inclusive a aproximadamente 5 % inclusive (v/v)). Por ejemplo, la concentración de sal añadida durante la etapa de extracción puede ser de aproximadamente 1 %, aproximadamente 2 %, aproximadamente 3 %, 15 aproximadamente 4 % o aproximadamente 5 %.

Los lípidos se extraen de los microorganismos alterados en ausencia de disolvente orgánico (p. ej., alcano C<sub>5</sub>-C<sub>12</sub>, alcano C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> clorado, alcohol C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o dióxido de carbono supercrítico). Como se utiliza en la presente memoria, en ausencia de disolvente orgánico significa menos de aproximadamente 0,5 % de disolvente basado en el peso de los  
20 microorganismos alterados (p. ej., menos de aproximadamente 0,4 %, menos de aproximadamente 0,3 %, menos de aproximadamente 0,2 %, menos de aproximadamente 0,1 %, menos de aproximadamente 0,05 %, menos de aproximadamente 0,01 %, menos de aproximadamente 0,005 %, o 0 %).

Opcionalmente, los lípidos se pueden extraer de los microorganismos alterados añadiendo un aceite (p. ej., aceite  
25 de coco) o biocombustible.

Opcionalmente, el aceite añadido durante la etapa de extracción puede ser un aceite nutricional (p. ej., un aceite derivado u obtenido de una fuente nutricional). Los ejemplos de aceites nutricionales adecuados para su uso en los métodos descritos en la presente memoria incluyen aceite de coco, aceite de palma, aceite de canola, aceite de girasol, aceite de soja, aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de cártamo, aceite de palmiste, aceite de algodón y combinaciones de los mismos. También podrían utilizarse derivados de cualquiera de esos aceites, tales como derivados alquilados (p. ej., aceites metilados o etilados).  
30

Como se utiliza en la presente memoria, el biocombustible se refiere a cualquier combustible, aditivo de combustible, compuesto aromático y/o alifático derivado de un material de partida de biomasa. Por ejemplo, los biocombustibles adecuados para su uso en los métodos descritos en la presente memoria pueden derivarse de fuentes vegetales o fuentes de algas. Los ejemplos de fuentes adecuadas para biocombustible incluyen algas, maíz, pasto aguja, caña de azúcar, remolacha azucarera, colza, soja y similares.  
35

Opcionalmente, los biocombustibles se pueden obtener recuperando aceites de una fuente biológica y convirtiendo los aceites en biocombustible. Los expertos en la materia conocen métodos para convertir aceites obtenidos de fuentes biológicas (p. ej., aceites obtenidos de fuentes vegetales y/o de algas). Opcionalmente, los métodos para obtener biocombustibles pueden incluir el cultivo de una biomasa de producción de aceite (p. ej., algas), extraer el aceite (p. ej., aceite de algas) y convertir el aceite (p. ej., aceite de algas) para formar un biocombustible.  
40

Opcionalmente, el aceite se puede convertir en un biocombustible mediante transesterificación. Como se utiliza en la presente memoria, la transesterificación se refiere a un proceso de intercambio de un grupo alcoxi de un éster con otro alcohol. Por ejemplo, un proceso de transesterificación para su uso en los métodos descritos en la presente memoria puede incluir la conversión de aceite de algas, p. ej., triglicéridos, en biodiésel, p. ej., ésteres de alquilo de ácido graso y glicerol. La transesterificación se puede lograr mediante el uso de procesos químicos tradicionales, como reacciones catalizadas con ácidos o bases, o mediante reacciones catalizadas con enzimas.  
45 50

Como se utiliza en la presente memoria, la expresión disolventes orgánicos no incluye biocombustibles, como se define ese término en la presente memoria, y no incluye aceites nutricionales, tales como aceite de coco, aceite de palma, aceite de canola, aceite de girasol, aceite de soja, aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de cártamo, aceite de palmiste, aceite de algodón o derivados alquilados (p. ej., metilados o etilados) de los mismos.  
55

Opcionalmente, el aceite o biocombustible utilizado para extraer los lípidos de los microorganismos alterados no se elimina posteriormente de los lípidos extraídos. Un fraccionamiento posterior del aceite extraído, en el que el aceite o biocombustible añadido se mantiene con solo una de las fracciones de aceite, no se considera eliminación del aceite o biocombustible del lípido extraído. Por ejemplo, después de la recuperación, los aceites descritos en la presente memoria pueden combinarse con otros aceites para su uso como en uno o más de los productos descritos en la presente memoria o incorporación de los mismos. Se puede añadir uno cualquiera de esos otros aceites o productos, como un biocombustible, a la mezcla de lípidos y biomasa durante la etapa de extracción como una alternativa, adición o combinación con un aceite recuperado después de la finalización del proceso de recuperación.  
60 65

La adición de otro aceite durante la etapa de extracción puede ayudar a la demulsificación y la separación del lípido

de la biomasa consumida.

En los métodos tradicionales que se basan en la extracción con disolventes orgánicos para separar los lípidos de la biomasa, el disolvente orgánico ha de eliminarse de los lípidos después de la recuperación, aunque normalmente al menos quedan pequeñas cantidades de traza de disolvente. Sin embargo, en los métodos descritos en la presente memoria, opcionalmente más de aproximadamente un 80 % del aceite o biocombustible añadido durante la etapa de extracción permanece en el aceite recuperado cuando se utiliza como un producto final o incorporado en el mismo. Es decir, opcionalmente menos de aproximadamente un 20 % del aceite o biocombustible añadido durante la etapa de extracción se elimina del aceite recuperado antes de su uso como producto final o incorporado en el mismo. Por ejemplo, opcionalmente menos de aproximadamente 15 %, menos de aproximadamente 10 %, menos de aproximadamente 5 %, menos de aproximadamente 2 %, o 0 % del aceite o biocombustible añadido durante la etapa de extracción se elimina del aceite recuperado antes de su uso como producto final o incorporado en el mismo.

Los microorganismos alterados o la biomasa pueden mezclarse con la sal, el aceite y/o el biocombustible durante un periodo de tiempo adecuado para extraer lípidos de los microorganismos alterados o la biomasa. Por ejemplo, la sal, el aceite y/o el biocombustible y los microorganismos alterados o la biomasa se pueden mezclar durante aproximadamente 10 minutos o más, 20 minutos o más, 30 minutos o más, 40 minutos o más, 50 minutos o más, 1 hora o más, o 2 horas o más. Posteriormente, el lípido se puede separar de los componentes restantes de la mezcla centrifugando la solución.

Opcionalmente, al menos 65 % de los lípidos producidos teóricamente por los microorganismos se extraen de los microorganismos alterados utilizando este método (es decir, el método proporciona al menos aproximadamente un rendimiento del 65 %). Por ejemplo, los rendimientos de los lípidos extraídos de los microorganismos alterados pueden ser al menos aproximadamente 70 %, al menos 75 %, al menos 80 % o al menos 85 %.

Alternativamente, la etapa de extracción se puede realizar en ausencia de aceite o biocombustible. Por ejemplo, los lípidos se pueden extraer mediante métodos mecánicos. La biomasa hidrolizada y los microorganismos pueden centrifugarse y los lípidos pueden separarse del resto de los componentes. La separación del aceite por centrifugación puede incluir opcionalmente una etapa de adición de sulfato de sodio a la emulsión de biomasa. Opcionalmente, la centrifugación puede realizarse a una temperatura alta como se describe en la presente memoria (p. ej., aproximadamente 55 °C y superior, tal como a aproximadamente 80 °C). Opcionalmente, los lípidos están contenidos en la capa superior del material centrifugado y pueden eliminarse por succión o decantación, por ejemplo, del otro material.

Opcionalmente, al menos aproximadamente 65 % de los lípidos producidos por los microorganismos se extraen de los microorganismos alterados utilizando este método (es decir, el método proporciona al menos un rendimiento del 65 %). Por ejemplo, los rendimientos de los lípidos extraídos de los microorganismos alterados pueden ser al menos 60 %, al menos 70 % o al menos 80 %, o al menos 90 % de la cantidad total producida.

### III. Productos

Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) (p. ej., ADH, AEP) y otros lípidos producidos según el método descrito en la presente memoria pueden utilizarse en cualquiera de una variedad de aplicaciones, por ejemplo, explotando sus propiedades biológicas o nutricionales. Opcionalmente, los compuestos pueden utilizarse en productos farmacéuticos, aceites nutricionales (p. ej., complementos nutricionales de aceites), complementos alimenticios, aditivos para alimentos para animales, cosméticos, biocombustibles y similares. Los lípidos producidos según los métodos descritos en la presente memoria también pueden utilizarse como productos intermedios en la producción de otros compuestos. Opcionalmente, los lípidos producidos según los métodos descritos en la presente memoria pueden incorporarse en un producto final (p. ej., un alimento o complemento alimenticio, una fórmula infantil, un producto farmacéutico, un combustible (p. ej., biocombustible), etc.).

Los alimentos o complementos alimenticios adecuados en los que se pueden incorporar los lípidos descritos en la presente memoria incluyen bebidas tales como leche, agua, bebidas deportivas, bebidas energéticas, té y zumos; confituras tales como gelatinas y galletas; alimentos y bebidas que contienen grasas, como productos lácteos; productos alimenticios procesados tales como arroz blando (o gachas); fórmulas infantiles; cereales para desayuno; o similares. Opcionalmente, uno o más lípidos producidos pueden incorporarse en un complemento dietético, como, por ejemplo, un multivitamínico. Opcionalmente, un lípido producido según el método descrito en la presente memoria puede incluirse en un complemento dietético y opcionalmente puede incorporarse directamente en un componente de alimento o pienso (p. ej., un complemento alimenticio).

Los ejemplos de alimentos para animales en los que se pueden incorporar lípidos producidos por los métodos descritos en la presente memoria incluyen alimentos para mascotas tales como alimentos para gatos; alimentos para perros y similares; alimentos para peces de acuario, peces de cultivo o crustáceos, etc.; alimentos para animales criados en granjas (incluyendo ganado y peces o crustáceos criados en acuicultura). El alimento o material de

alimentación para animales en el que se pueden incorporar los lípidos producidos según los métodos descritos en la presente memoria es preferentemente agradable al organismo que es el receptor previsto. Este alimento o material de alimentación para animales puede tener propiedades físicas conocidas actualmente para un material alimenticio (p. ej., sólido, líquido, blando).

5 Opcionalmente, uno o más de los compuestos producidos (p. ej., AGPI) se pueden incorporar a un producto farmacéutico. Los ejemplos de tales productos farmacéuticos incluyen varios tipos de comprimidos, cápsulas, agentes bebibles, etc. Opcionalmente, el producto farmacéutico es adecuado para aplicación tópica. Las formas de dosificación pueden incluir, por ejemplo, cápsulas, aceites, gránulos, gránulos de subtila, pulvere, tabella, pilula, 10 trochiscia o similares.

Opcionalmente, uno o más de los compuestos producidos pueden utilizarse o incorporarse en un biocombustible. Por ejemplo, los biocombustibles pueden producirse por transesterificación de uno o más de los compuestos producidos. Se puede producir un biocombustible mediante la transesterificación catalizada por base de un aceite 15 producido, la transesterificación catalizada por ácido del aceite o la conversión del aceite en sus ácidos grasos y luego a biocombustible.

Los lípidos producidos según los métodos descritos en la presente memoria pueden incorporarse en productos como se describe en la presente memoria mediante combinaciones con cualquiera de una variedad de agentes. Por 20 ejemplo, tales compuestos se pueden combinar con uno o más aglutinantes o materiales de relleno. En algunas realizaciones, los productos pueden incluir uno o más agentes quelantes, pigmentos, sales, tensioactivos, humectantes, modificadores de la viscosidad, espesantes, emolientes, fragancias, conservantes, etc., y combinaciones de los mismos.

25 Los ejemplos a continuación tienen por objeto ilustrar adicionalmente ciertos aspectos de los métodos y composiciones descritos en la presente memoria, y no tienen por objeto limitar el alcance de las reivindicaciones.

## EJEMPLOS

### 30 Ejemplo 1. Pasteurización, recogida y lavado, e hidrólisis química.

#### *Pasteurización*

La biomasa T18 se calentó con agitación a 60 °C durante 1 hora para pasteurizar las células.

#### 35 *Recogida y lavado*

La biomasa T18 pasteurizada se centrifugó a 4150 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente para separar el medio final de la pasta celular. Se eliminaron los medios y se añadió una masa equivalente de agua a la pasta 40 celular para lavar las células. La mezcla de pasta celular y agua se agitó durante 1 minuto, se volvió a centrifugar y se eliminó la fase acuosa.

#### *Hidrólisis química*

45 La pasta celular T18 lavada con agua se ajustó a 150 g/l con agua. Se extrajeron las submuestras (10 ml) y se añadieron a tubos de centrifuga de 50 ml. Cada submuestra se trató con ácido o base hasta una concentración final según la Tabla 1. Las mezclas se esterizaron en autoclave a 121 °C durante 15 minutos para hidrolizar las células. Después de la hidrólisis, las muestras se extrajeron con hexano para determinar el porcentaje de aceite recuperado por equilibrio de masa (Figura 1). La hidrólisis con HCl 160 mM y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dio como resultado recuperaciones de 50 aceite de más del 85 %.

**Tabla 1:**

Número de muestra	Tipo de ácido/base	Concentración (nM)	Recuperación de aceite (%)
1	HCl	40	1
2	HCl	100	47
3	HCl	160	100
4	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	40	12
5	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	100	3
6	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	160	5
7	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	40	7
8	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100	68
9	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	160	94
10	NaOH	40	8
11	NaOH	100	40

Número de muestra	Tipo de ácido/base	Concentración (nM)	Recuperación de aceite (%)
12	NaOH	160	52
13	KOH	40	8
14	KOH	100	20
15	KOH	160	54

### Ejemplo 2. Hidrólisis enzimática

Una pasta celular T18 lavada con agua se ajustó a 220 g/l con agua. El pH se ajustó a 7,5 con NaOH 1 N. Se extrajeron las submuestras (10 ml) y se añadieron a tubos de centrifuga de 50 ml. Cada submuestra se trató con enzima según la Tabla 2. Las mezclas se incubaron con agitación a 50 °C durante 22 horas para hidrolizar las células. Después de la hidrólisis, las muestras se extrajeron con hexano para determinar el porcentaje de aceite recuperado por equilibrio de masa (Figura 2). La hidrólisis con Alcalase sola o en combinación con otra enzima dio como resultado recuperaciones de aceite de más del 85 %.

10

**Tabla 2:**

Número de muestra	Enzima	Concentración (% v/v)	Recuperación de aceite (%)
1	Viscozyme	0,2	0,1
2		0,4	0,3
3	Alcalase	0,2	96
4		0,4	96
5	Flavourzyme	0,2	1
6		0,4	0,3
7	Mannaway	0,2	0
8		0,4	0,8
9	Alcalase/Viscozyme	0,2/0,2	93
10	Alcalase/Mannaway	0,2/0,2	91
11	Flavourzyme/Mannaway	0,2/0,2	0,3

### Ejemplo 3. Hidrólisis ácida y enzimática, efecto del lavado

Se añadieron submuestras de biomasa T18 pasteurizada, no lavada (10 ml) a tubos de centrifuga de 50 ml. Los controles se lavaron con agua, se ajustaron a 170 g/l de agua y se submuestrearon en tubos de centrifuga de 50 ml. Cada submuestra se trató con ácido o enzima según la Tabla 3. Las muestras hidrolizadas con ácido se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 15 minutos para hidrolizar las células. Las muestras hidrolizadas enzimáticamente se ajustaron a pH 7,5 con NaOH 1 N y se incubaron con agitación a 50 °C durante 26 horas para hidrolizar las células. Después de la hidrólisis ácida o enzimática, las muestras se extrajeron con hexano para determinar el porcentaje de aceite recuperado por equilibrio de masa (Figura 3). Las recuperaciones de aceite no lavado equivalentes a las recuperaciones de aceite lavado se lograron con hidrólisis de Alcalase al 0,2 %.

20

**Tabla 3:**

Número de muestra	Lavada/no lavada	Tratamiento con ácido/enzima	Concentración	Aceite recuperado (%)
1	No lavada	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	40 mM	5
2	Lavada	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	40 mM	61
3	No lavada	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	160 mM	27
4	Lavada	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	160 mM	91
5	No lavada	Alcalase	0,2 % v/v	93
6	Lavada	Alcalase	0,2 % v/v	94

25

### Ejemplo 4. Hidrólisis enzimática, efecto de temperatura/tiempo

La pasta celular T18 lavada con agua se ajustó a 210 g/l con agua. El pH se ajustó a 7,5 con NaOH 1 N. Se añadieron las submuestras (10 ml) en tubos de centrifuga de 50 ml. Cada submuestra se trató con Alcalase al 0,2 % v/v. Las mezclas se incubaron con agitación a 70 °C durante 4 horas para hidrolizar las células. Los controles se incubaron con agitación a 55 °C durante 18 horas. Después de la hidrólisis, las muestras se extrajeron con hexano para determinar el porcentaje de aceite recuperado por equilibrio de masa (Figura 4). Al aumentar la temperatura a 70 °C, se lograron recuperaciones de aceite equivalentes a la hidrolización a 55 °C durante 18 horas en 4 horas.

30

### Ejemplo 5. Hidrólisis enzimática, extracción con biocombustible

La pasta celular T18 lavada con agua se ajustó a 200 g/l con agua, y el pH se ajustó a 7,5 con NaOH 1 N. Se

35

extrajeron las submuestras (10 ml) y se añadieron a tubos de centrifuga de 50 ml. Cada submuestra se trató con Alcalase al 0,2 % v/v. Las mezclas se incubaron con agitación a 55 °C durante 18 horas para hidrolizar las células. Después de la hidrólisis, cada submuestra se extrajo con biocombustible según la Tabla 5 y el porcentaje de aceite se determinó por equilibrio de masa y en base al perfil de clase de lípidos de los aceites puros (Figura 5 y Tabla 5).

- 5 La extracción con 1:0,4 (biomasa húmeda:biocombustible) dio como resultado recuperaciones de aceite superiores al 85 % según el perfil de la clase de lípidos. El aceite de algas de triglicéridos (TG) se etiló (EE) y se utilizó para la extracción de aceite, así como el aceite TG original (Tabla 6). Todas las relaciones de biomasa húmeda:aceite de algas EE dio como resultado recuperaciones de aceite de más del 85 % según el perfil de la clase de lípidos.

10

Tabla 5:

Relación de biomasa húmeda:biocombustible	Relación de TG:EE-FFA	% de aceite de alga	% real de aceite de alga	Aceite recuperado (%)
Aceite de alga puro	52,8	100		
1:2	0,0455	4,45	7,96	56
1:1	0,0764	7,44	14,7	51
1:0,4	0,268	20,48	23,5	96
1:0,2	0,42	31,42	46,4	68
Biocombustible	0,00291	0		

Tabla 6:

Relación de biomasa húmeda:aceite de recuperación	Eficacia de extracción de aceite (según el equilibrio de masa) (%)	Eficacia de extracción de aceite (según la relación de ADH:ácido oleico) (%)
Biocombustible		
1:2	76	56
1:1	54	51
1:0,4	59	96
1:0,2	54	68
Aceite de alga TG		
1:2	52	
1:1	40	
1:0,4	34	
1:0,2	43	
Aceite de alga EE		
1:2	76	100
1:1	70	100
1:0,4	75	100
1:0,2	83	100

#### Ejemplo 6. Hidrólisis enzimática, extracción de aceite sin disolvente

15

Una biomasa T18 no lavada de 200 ml a una concentración de sólidos de 224 g/l (concentración de biomasa de 159 g/l) se calentó a 55 °C y se ajustó a pH 8 con NaOH 1 N. La muestra se trató con Alcalase al 0,4 % (v/v) y se incubó con agitación a 55 °C durante 18 horas para hidrolizar las células. Después de la hidrólisis, la muestra se centrifugó a 4600 rpm durante 20 minutos a 40 °C para separar los medios de la biomasa hidrolizada concentrada. Se eliminó el 85 % de los medios. Después de la eliminación acuosa, la muestra restante se centrifugó a 4600 rpm durante 20 minutos a 40 °C para separar el aceite de la biomasa consumida. El aceite se recuperó y se determinó el % de aceite recuperado por equilibrio de masa. Al reducir la concentración acuosa después de la hidrólisis, se logró una recuperación de aceite de más del 90 % mediante extracción con aceite sin disolvente.

20

#### 25 Ejemplo 7. Extracción de aceite sin disolvente a gran escala

Una biomasa T18 no lavada de 151.400 kg a una concentración de biomasa de 111 g/l se calentó a 55 °C y se ajustó a pH 8 con NaOH 50 N. Se añadieron 606 l de Alcalase, el pH se ajustó de nuevo a 8 y la mezcla se recirculó entre 2 recipientes para mezclar para la hidrólisis a 55 °C durante 18 horas. Después de la hidrólisis, el peso del caldo fue de 160.400 kg. La biomasa hidrolizada se mantuvo a 55 °C para centrifugación para separar los medios de la biomasa hidrolizada concentrada (Figura 6). Se eliminaron 134.400 kg de medio y se recuperaron 26.000 kg de biomasa hidrolizada concentrada. La biomasa hidrolizada concentrada se trató con 1300 kg de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se calentó con mezcla a 90 °C antes de la centrifugación para separar el aceite de la biomasa consumida (Figura 7). Se recuperaron 7606 kg de aceite para una recuperación total de aceite de 82 %. El índice de peróxido (IP) y el índice de ácido (IA) del aceite recuperado fueron 0,4 meq/kg y 0,38 mg de KOH/g, respectivamente.

30

35

#### Ejemplo 8. Concentración de enzima optimizada/tiempo (enzima al 0,1 %)

Una muestra de biomasa T18 no lavada a una concentración de biomasa de 143 g/l se calentó a 55 °C y se ajustó a pH 8,0 con NaOH 1 N. Se extrajeron submuestras de 25 ml en tubos de centrifuga de 50 ml. Cada submuestra se trató según la Tabla 7. Las mezclas se incubaron con agitación a 55 °C para hidrolizar las células. Después de la hidrólisis, las muestras se colocaron en un baño a 100 °C durante 20 minutos para desactivar la enzima. Después de la desactivación de la enzima, las muestras se centrifugaron a 4600 rpm durante 20 minutos a 40 °C para separar los medios de la biomasa hidrolizada concentrada. Se eliminó aproximadamente el 80 % de los medios. Los medios se pasaron a través de un filtro de 0,25 µm y el grado de hidrólisis se determinó mediante el método de o-paldialdehído (OPA) (Spellman, D., McEvoy, E., O'Cuinn, G. y Fitz, G. R. J. 2003. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *International Dairy Journal*, 13: 447-453). Véase la Tabla 7.

La biomasa hidrolizada concentrada se trató con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5 % (p/v) y se calentó con agitación a 70 °C durante 60 minutos. Después del tratamiento, las muestras se centrifugaron a 4600 rpm durante 20 minutos a 40 °C para separar el aceite de la biomasa consumida. Se recuperó el aceite y se determinó el % de aceite recuperado por equilibrio de masa (Figura 8). La hidrólisis con Alcalase al 0,1 % se completó después de 4 horas.

Tabla 7:

Número de muestra	Concentración de enzima (% v/v)	Tiempo de hidrólisis (h)	Recuperación de aceite (%)	Concentración de aminoácidos (mM)
1	0	0	<5 %	26,4
2	0,1	0	82,6	38,2
3	0	2	<5 %	24,3
4	0,1	2	83,9	41,5
5	0	4	<5 %	22,6
6	0,1	4	86,1	46,3
7	0	6	<5 %	23,6
8	0,1	6	85,9	47,5
9	0	24	<5 %	23,5
10	0,1	24	89,1	51,5

#### Ejemplo 9. Concentración de enzima optimizada/tiempo (0,05 % de enzima)

Una muestra de biomasa T18 no lavada a una concentración de biomasa de 143 g/l se calentó a 55 °C y se ajustó a pH 8,0 con NaOH 1 N. Se extrajeron 25 ml de submuestras en tubos de centrifuga de 50 ml. Cada submuestra se trató según la Tabla 8. Las mezclas se incubaron con agitación a 55 °C para hidrolizar las células. Después de la hidrólisis, las muestras se colocaron en un baño a 100 °C durante 20 minutos para desactivar la enzima. Después de la desactivación enzimática, las muestras se centrifugaron a 4600 rpm durante 20 minutos a 40 °C para separar los medios de la biomasa hidrolizada concentrada. Se eliminó aproximadamente el 80 % de los medios. Los medios se pasaron a través de un filtro de 0,25 µm y el grado de hidrólisis se determinó mediante el método OPA (Tabla B).

La biomasa hidrolizada concentrada se trató con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5 % (p/v) y se calentó con agitación a 70 °C durante 60 minutos. Después del tratamiento, las muestras se centrifugaron a 4600 rpm durante 20 minutos a 40 °C para separar el aceite de la biomasa consumida. Se recuperó el aceite y se determinó el % de aceite recuperado por equilibrio de masa (Figura 9). La hidrólisis con Alcalase al 0,05 % se completó después de 6 horas.

Tabla 8:

Número de muestra	Concentración de enzima (% v/v)	Tiempo de hidrólisis (h)	Recuperación de aceite (%)	Concentración de aminoácidos (mM)
1	0	0	<5 %	45,2
2	0,05	0	69,7	49,0
3	0	2	<5 %	41,7
4	0,05	2	85,7	52,6
5	0	4	<5 %	42,8
6	0,05	4	82,5	55,6
7	0	6	<5 %	43,1
8	0,05	6	79,1	56,9
9	0	24	<5 %	39,9
10	0,05	24	86,2	53,9

#### Ejemplo 10. Hidrólisis enzimática, pH bajo

Se extrajeron 150 ml de submuestras de T18 no lavadas en un vaso de precipitados de 250 ml. Cada submuestra se trató con HCl 1 M o NaOH para ajustar al pH deseado según la Tabla 9. Se extrajeron 30 ml de submuestras de cada condición de pH a tubos de centrifuga de 50 ml. Cada submuestra se trató con Alcalase al 0,5 % (v/v). Las

mezclas se incubaron con agitación a 55 °C durante 16 horas para hidrolizar las células. Después de la hidrólisis, las muestras se centrifugaron a 4600 rpm durante 20 minutos a 40 °C para separar los medios de la biomasa hidrolizada concentrada. Aproximadamente se eliminó el 60 % de los medios. La biomasa hidrolizada concentrada se trató con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5 % (p/v) y se calentó con agitación a 70 °C durante 60 minutos para separar el aceite de la biomasa consumida. Se recuperó el aceite y se determinó el % de aceite recuperado sin disolventes mediante equilibrio de masa. Figura. 10. Se lograron recuperaciones de aceite equivalentes a pH 5,5 y 8.

**Tabla 9**

Número de muestra	pH para hidrólisis	Recuperación de aceite (%)
1	8	66,9±2,3
2	3,5	0
3	4,5	0
4	5,5	60,3±5,9
5	6,5	70,4±1,0
6	7,5	71,0±5,6

**10 Ejemplo 11. Hidrólisis enzimática, enzimas alternativas**

Se extrajeron 30 ml de submuestras de biomasa T18 no lavada a tubos de centrifuga de 50 ml. Cada submuestra se trató con enzima al 0,5 % (v/v) y según la Tabla 9. Las mezclas se incubaron con agitación a 55 °C para hidrolizar las células. Después de la hidrólisis, las muestras se centrifugaron a 4600 rpm durante 20 minutos a 40 °C para separar los medios de la biomasa hidrolizada concentrada. Se eliminó aproximadamente el 50 % de los medios. La biomasa hidrolizada concentrada se trató con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5 % (p/v) y se calentó con agitación a 70 °C durante 60 minutos. Después del tratamiento, las muestras se extrajeron con hexano para determinar el % de aceite recuperado por equilibrio de masa. Aunque no se identificó una enzima alternativa que fuera tan eficaz como Alcalase para la hidrólisis, se podrían utilizar enzimas seleccionadas (Proteasa "M", Savinase Ultra, Blaze Evity o Polarzyme) en lugar de Alcalase si fuera necesario.

**Tabla 10**

Numero de muestra	Concentración de biomasa (g/l)	Enzima	pH	Extracción de aceite (%)
1	171	Alcalase	8	89
2	171	Proteasa "M"	6	64
3	171	Celulasa "A"	4,5	6,7
4	171	Hemicelulasa 90	4,5	6,1
5	171	Proteasa/celulosa/hemicelulosa	5	28
6	171	Proteasa/celulosa	5	12
7	171	Proteasa/hemicelulosa	5	20
8	171	Proteasa/hemicelulosa	4,5	5,0
9	138	Alcalase	8	98
10	138	Savinase Ultra	8	94
11	138	Blaze Evity	8	93
12	138	Neutrased	8	7,2
13	150	Alcalase	8	92
14	150	Polarzyme	8	88

**Ejemplo 12. Hidrólisis mecánica**

Se suministró una muestra de biomasa T18 no lavada a una concentración de biomasa de 180 g/l en una cámara de acero inoxidable Dyno-Mill Multi Lab de 300 ml cargada con medio de molienda de óxido de circonio de 0,6-0,8 mm (80 % (v/v) de volumen de microesfera). En el modo continuo, la molienda de microesferas funcionaba a velocidades de punta del impulsor de 10 m/s y caudales de suministro de 80 ml/min. Se pasó una submuestra de suspensión de biomasa parcialmente alterada a través de la cámara de alteración para un segundo pase. Las suspensiones de biomasa se centrifugaron a 4600 rpm durante 20 minutos a 40 °C para separar el aceite de la biomasa consumida. El aceite se recuperó y se determinó el % de aceite recuperado por equilibrio de masa. 1 y 2 pases produjeron recuperaciones de aceite del 70 %.

## REIVINDICACIONES

1. Un método de recuperación de lípidos de una población de microorganismos que comprende:
- 5 (a) poner en contacto la población de microorganismos con una o más enzimas en condiciones que causen una alteración en los microorganismos, en el que la etapa de contacto se realiza en presencia de un 0,001 % a un 0,4 % en volumen/volumen de enzima durante una a veinte horas a una temperatura de 50 °C a 70 °C;
- 10 (b) concentrar los microorganismos alterados con los lípidos produciendo una capa gruesa y una capa ligera y separar la capa gruesa que comprende los componentes solubles de los medios de fermentación y el agua de la capa ligera que comprende prácticamente todos los microorganismos alterados en forma de lípidos y biomasa consumida; y
- 15 (c) extraer lípidos de los microorganismos alterados a una temperatura elevada de 55 °C a 95 °C en presencia de una sal y en ausencia de disolventes orgánicos, en el que la ausencia de disolvente orgánico significa menos de aproximadamente un 0,5 % de disolvente en base al peso de los microorganismos alterados, en donde la extracción separa los lípidos de los microorganismos.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de contacto se realiza a un pH de 5 a 8,5, opcionalmente a un pH de 8,0; o en el que la etapa de contacto se realiza de una a ocho horas.
- 20 3. El método de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que la enzima es una proteasa, en el que opcionalmente la enzima es Alcalase 2,4 L.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la concentración de enzima está entre 0,05 y 0,2 % volumen/volumen, en donde opcionalmente la concentración de enzima es 0,1 % volumen/volumen.
- 25 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la etapa de contacto se realiza en presencia de 0,05 % a 0,2 % de enzima de una a ocho horas a aproximadamente 55 °C; o en donde la etapa de contacto se realiza en ausencia de tensioactivos.
- 30 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la etapa de concentración comprende centrifugación; o en el que la etapa de concentración comprende 25 % a 95 % de eliminación acuosa, en el que opcionalmente la etapa de concentración comprende 50 % a 85 % de eliminación acuosa.
- 35 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la temperatura elevada durante la etapa de extracción es de 75 °C a 95 °C, en el que opcionalmente la temperatura elevada durante la etapa de extracción es de 90 °C
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la concentración de sal añadida durante la etapa de extracción es del 1 % al 5 %.
- 40 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la sal añadida durante la etapa de extracción es sulfato de sodio.
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la población de microorganismos se selecciona del grupo que consiste en algas, hongos, bacterias y protistas.
- 45 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la población de microorganismos se selecciona entre el género *Thraustochytrium*, *Schizochytrium* y mezclas de los mismos, en el que opcionalmente la población de microorganismos es una *Thraustochytrium sp.* depositada con el número de acceso ATCC PTA-6245.
- 50 12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que los lípidos comprenden ácido docosahexaenoico.
13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la ausencia de disolvente orgánico significa menos de 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,05 %, 0,01 % o 0,005 %, basado en el peso de los microorganismos alterados.
- 55 14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la ausencia de disolvente orgánico significa 0 %, basado en el peso de los microorganismos alterados.
- 60

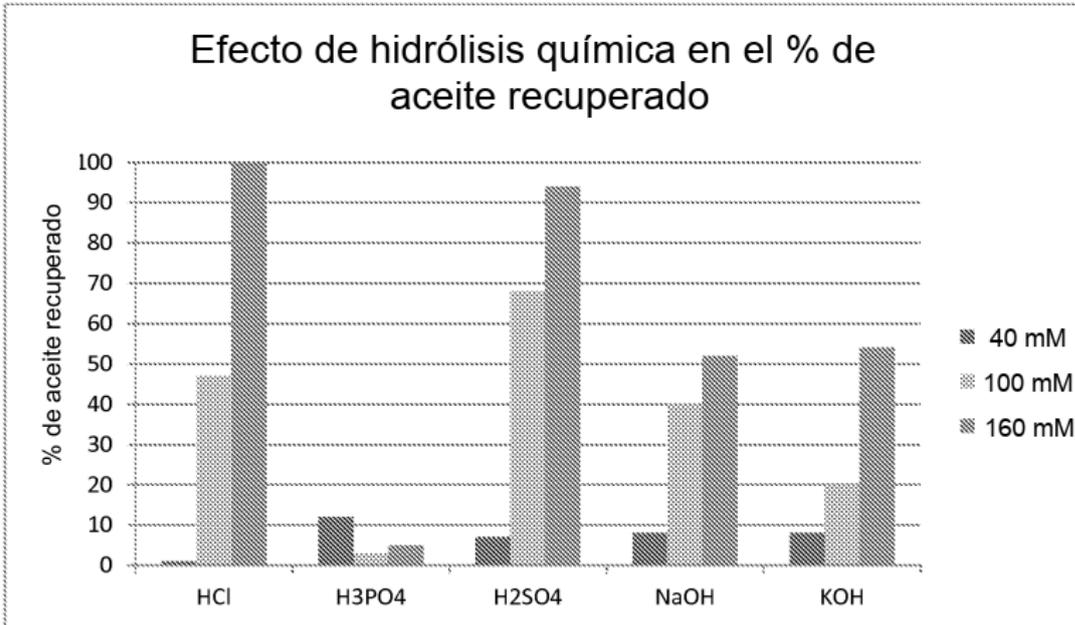


Figura 1

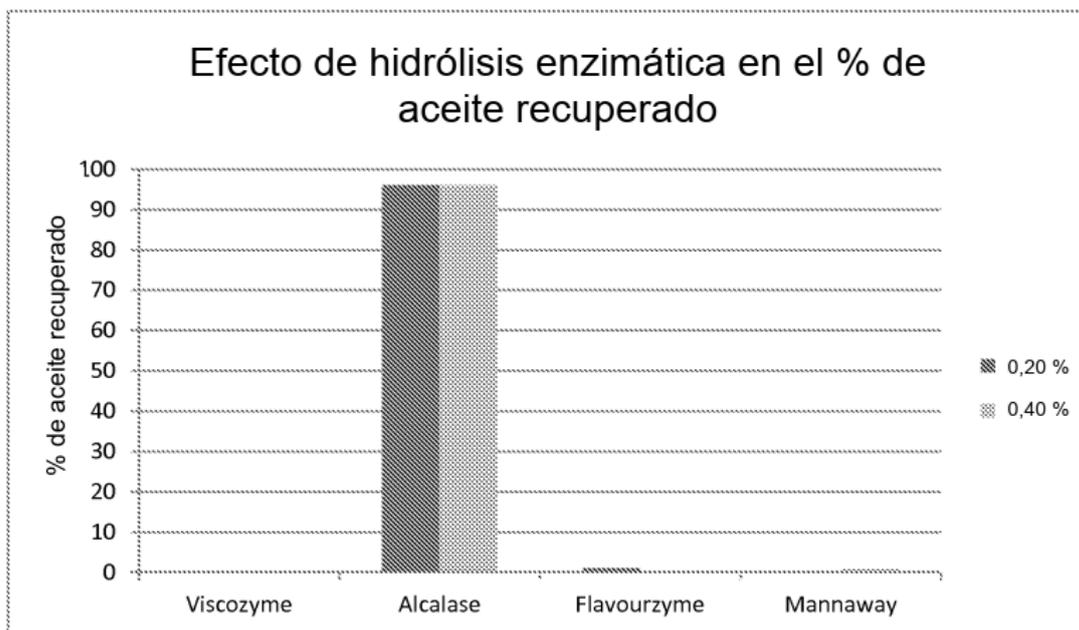


Figura 2

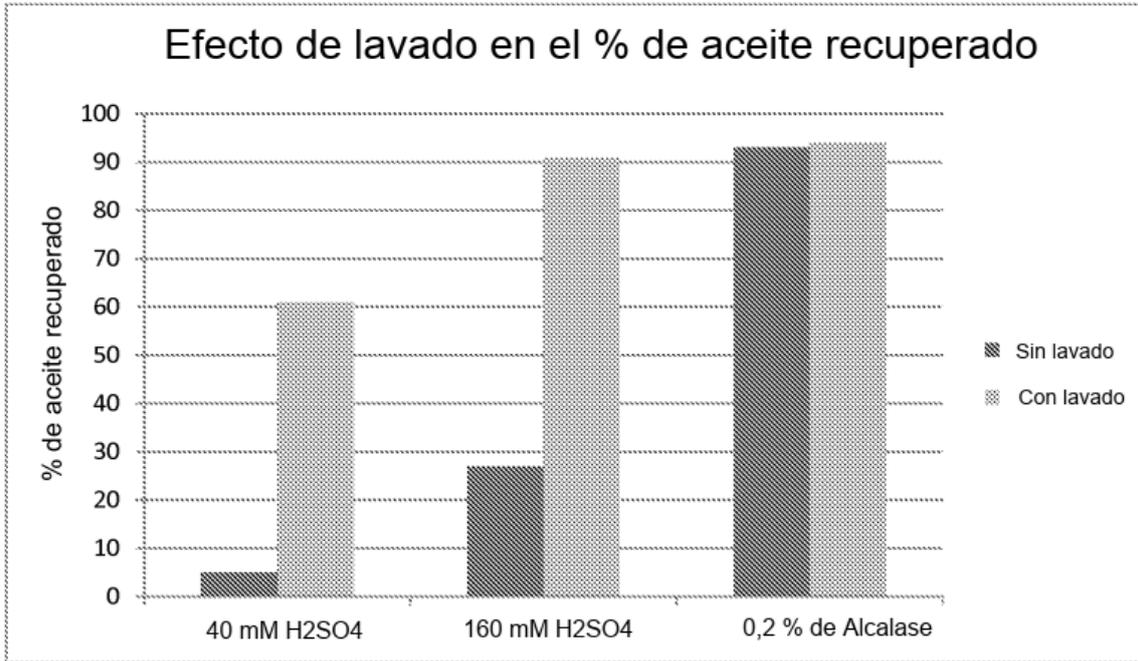


Figura 3

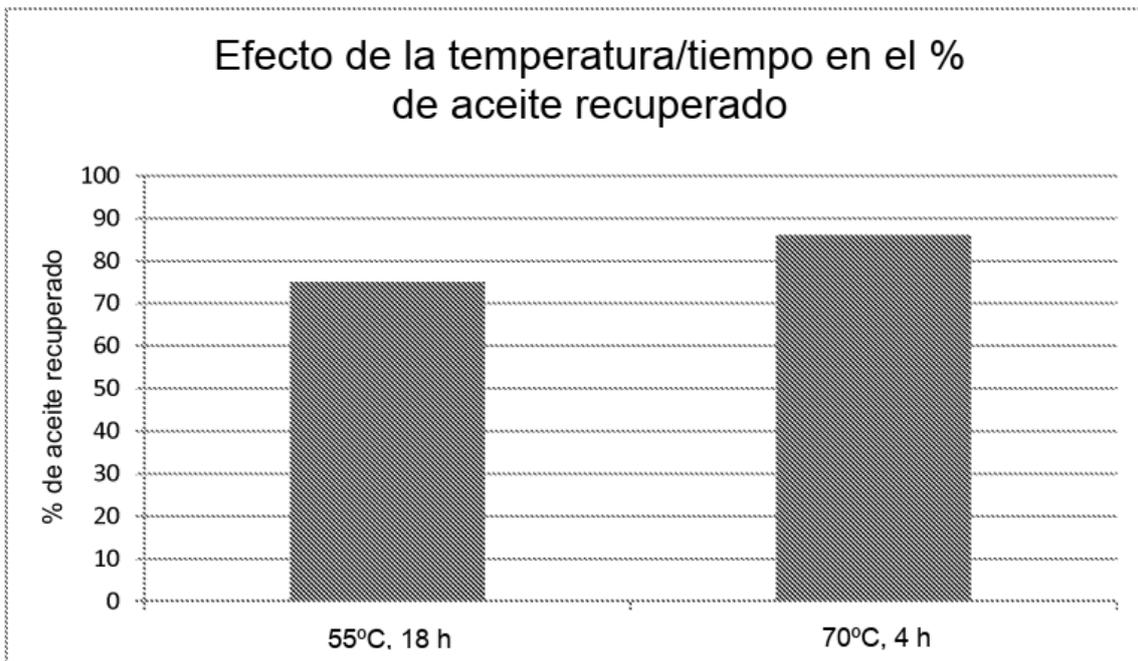


Figura 4

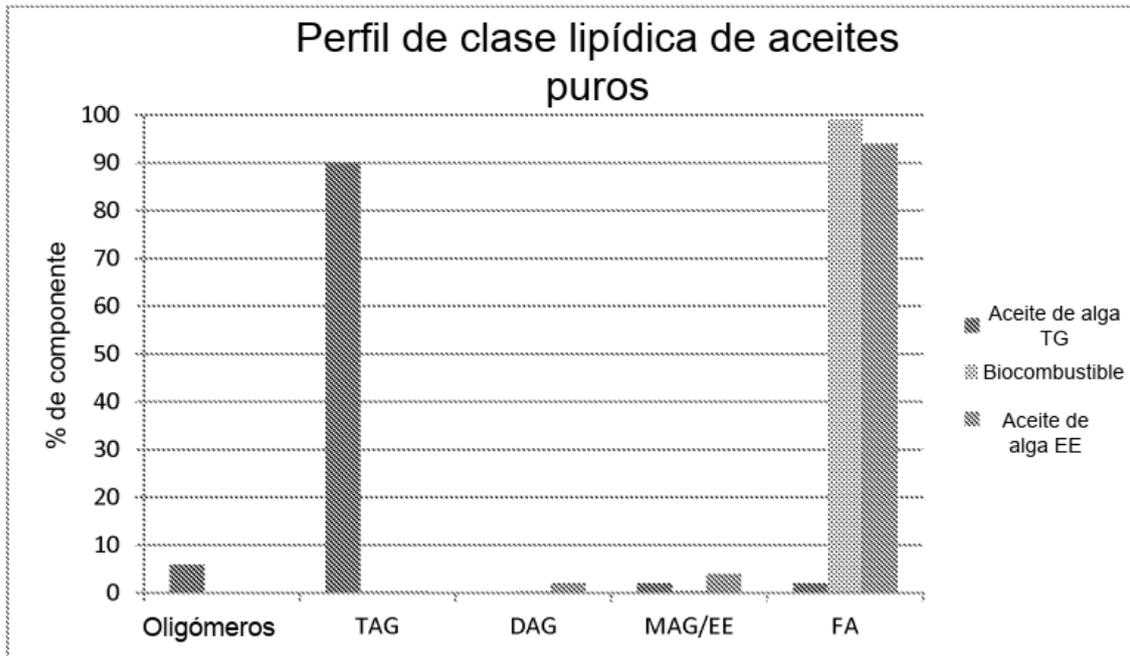


Figura 5

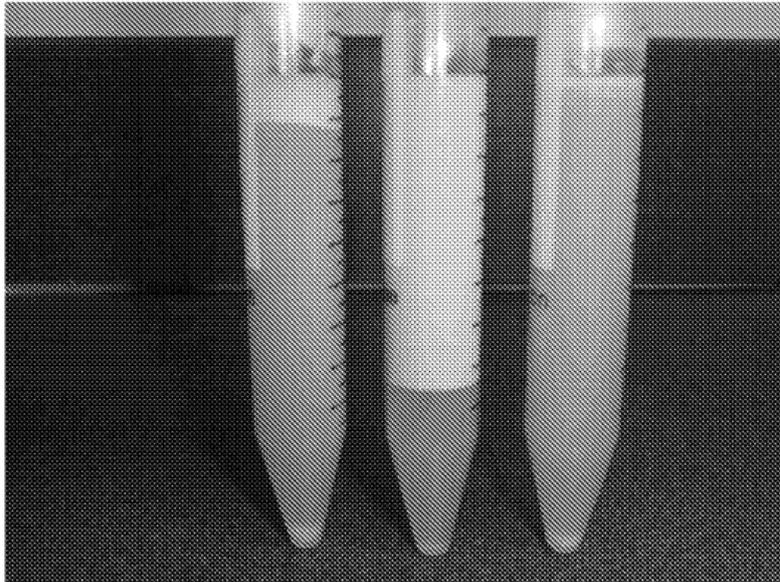


Figura 6

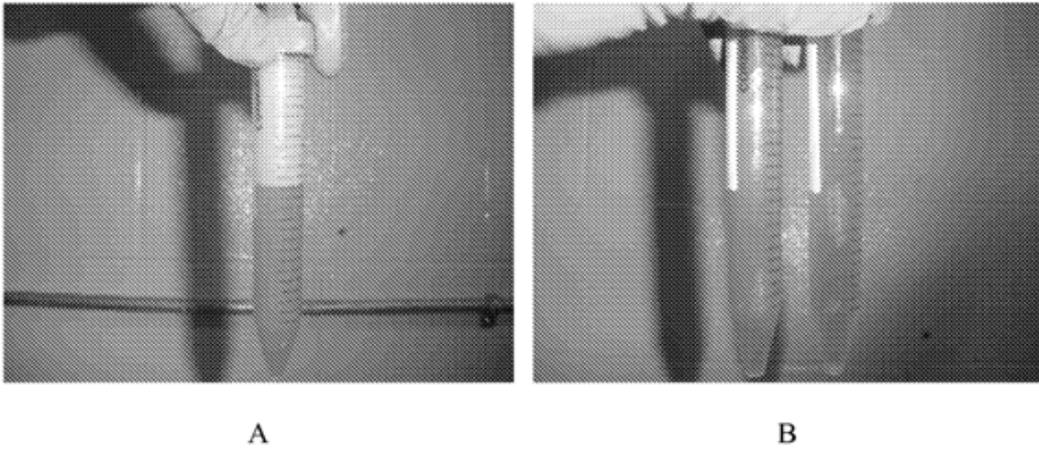


Figura 7

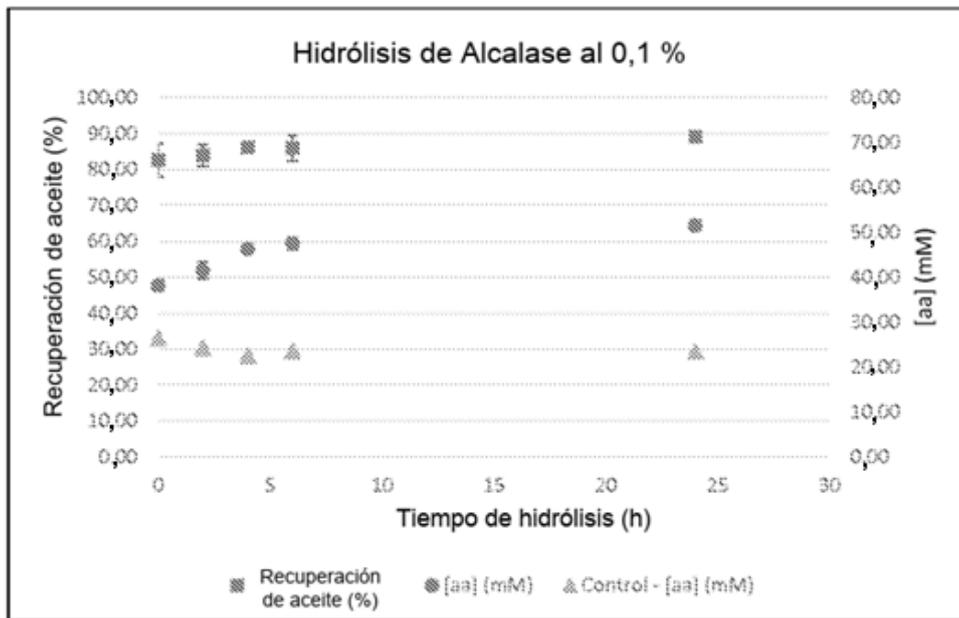


Figura 8

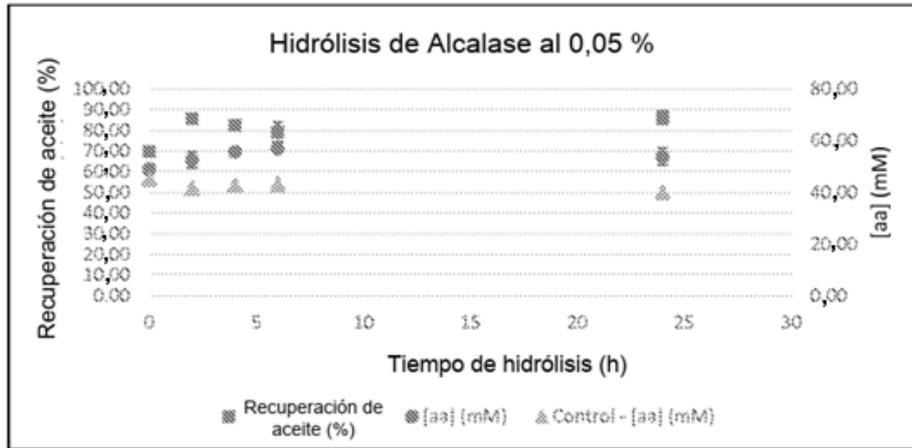


Figura 9

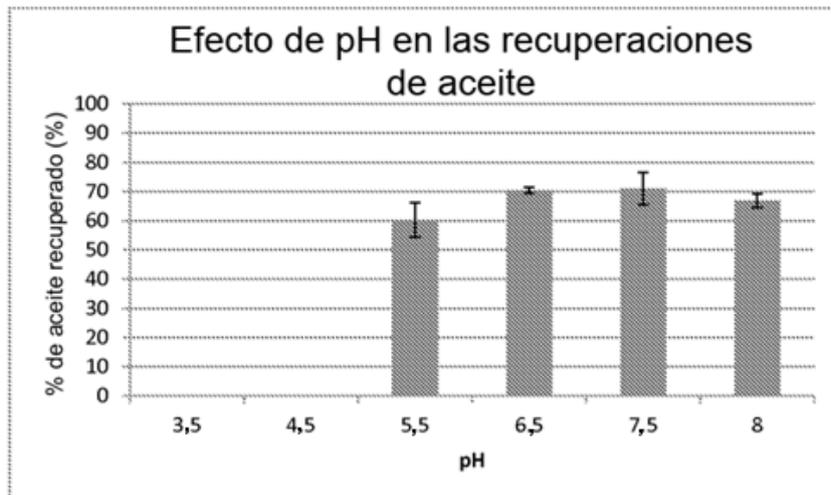


Figura 10