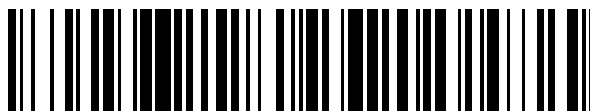


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 452**

51 Int. Cl.:

C12P 7/64 (2006.01)

C12N 1/00 (2006.01)

C12N 1/10 (2006.01)

C12P 7/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.05.2015 PCT/IB2015/001407**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.11.2015 WO15177641**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.05.2015 E 15795730 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2019 EP 3146060**

54 Título: **Métodos de producción de aceite en microorganismos**

30 Prioridad:

22.05.2014 US 201462001912 P

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

21.07.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SUN, ZHIYONG;
ARMENTA, ROBERTO, E. y
VALENTINE, MERCIA**

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

ES 2 774 452 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 producción de aceite en microorganismos

5 ANTECEDENTES

En el campo de la producción de aceite mediante la fermentación de microorganismos eucariotas, se han establecido y aceptado ampliamente determinadas estrategias. Una de esas estrategias para evitar la inhibición de nutrientes y lograr una alta concentración celular es utilizar la fermentación discontinua alimentada, en la cual los sustratos principales (principalmente las fuentes de carbono) se añaden en incrementos para mantener un suministro continuo mientras se evitan altas concentraciones de sustratos en el medio de fermentación. Sin embargo, la fermentación discontinua alimentada generalmente requiere una planificación cuidadosa del régimen de alimentación del sustrato y una monitorización y control intensivo de la fermentación en tiempo real, lo que exige una gran cantidad de mano de obra y puede conducir a una alta tasa de fallos de la operación de fermentación.

Otro coste significativo relacionado con la fermentación a escala industrial incluye procedimientos relacionados con la esterilización. Estos costes incluyen fermentadores de recipientes de presión costosos y sistemas de vapor en sitio, así como los costes operativos asociados para generar el vapor.

Los documentos US-A1-2012/244584, WO-A-2005/045050 y WO-A-2005/021735 divulgan métodos para producir ácidos grasos poliinsaturados en los que una especie del género *Thraustochytrium* se cultiva en un medio que comprende una fuente de carbono. La concentración de glucosa puede ser tan alta como 200 g/l o superior.

A. Burja et al.: "Isolation and characterization of polyunsaturated fatty acid producing *Thraustochytrium* species: screening of strains and optimization of omega-3 production" *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 72, n.º 6, 2006, páginas 1161-1169 enseña la producción de PUFA (por sus siglas en inglés) por fermentación de *Thraustochytrium*, p. *Thraustochytrium* ONC-T18, e investiga las concentraciones de la fuente de carbono entre 50 y 160 g/l para optimizar el rendimiento.

30 SUMARIO

En el presente documento se proporcionan métodos para producir uno o más ácidos grasos poliinsaturados. Los métodos incluyen las etapas de proporcionar un microorganismo *Thraustochytrium* capaz de producir ácidos grasos poliinsaturados, proporcionar un medio que comprende una o más fuentes de carbono, a un primer nivel de concentración superior a 200 g/l, cultivar el microorganismo *Thraustochytrium* en el medio hasta que el primer nivel de concentración de la fuente de carbono se reduzca de 0 a 20 g/l; añadir al medio una segunda concentración de una o más fuentes de carbono de más de 200 g/l; y cultivar el microorganismo *Thraustochytrium* en el medio en condiciones suficientes para producir el uno o más ácidos grasos poliinsaturados.

El método es adecuado para reducir la contaminación de un cultivo no estéril de uno o más microorganismos. El método incluye cultivar los microorganismos (i) en presencia de una alta concentración de una o más fuentes de carbono, y opcionalmente en combinación con condiciones (ii) de pH bajo, en donde el cultivo reduce la contaminación del cultivo no estéril que comprende los microorganismos.

Se proporcionan métodos para cultivar uno o más microorganismos *Thraustochytrium*. Los métodos de la reivindicación 1 comprenden cultivar los microorganismos en un medio que comprende una primera cantidad de una o más fuentes de carbono a un primer nivel de concentración, monitorizar una concentración de fuentes de carbono hasta que la concentración de fuentes de carbono se reduzca por debajo del primer nivel de concentración y añadir al medio una segunda cantidad de una o más fuentes de carbono para aumentar la concentración de fuentes de carbono a un segundo nivel de concentración.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es un gráfico que muestra el perfil temporal de la concentración de células ONC-T18 (biomasa ("X")) y el contenido total de ácidos grasos (% de TFA, por sus siglas en inglés) durante una fermentación de 2 litros (l). La Figura 2 es un gráfico que muestra el perfil temporal de la concentración de células ONC-T18 (biomasa ("X")) y el contenido total de ácidos grasos (% de TFA) durante una fermentación de 5 l. La Figura 3 es un gráfico que muestra el perfil temporal de la concentración de células ONC-T18 (biomasa ("X")) y el contenido total de ácidos grasos (% de TFA) durante una fermentación de 30 l. La Figura 4 es un gráfico que muestra el perfil temporal de la concentración de células ONC-T18 y ATCC20888 durante fermentaciones paralelas de alto contenido de glucosa usando la misma fórmula de medio de fermentación (fórmula ONC). La Figura 5 es un gráfico que muestra el perfil temporal de la concentración de células ONC-T18 y ATCC20888 durante fermentaciones paralelas con alto contenido de glucosa usando la fórmula de medio de fermentación ONC

para ONC-T18 y una fórmula de medio de fermentación diferente para ATCC20888.

La Figura 6 es un gráfico que muestra el perfil temporal de la concentración de células ONC-T18 (biomasa ("X")) y la concentración de glucosa durante una fermentación discontinua múltiple de 30 l con alto contenido de glucosa.

La Figura 6 y la Figura 3 muestran datos de la misma fermentación de 30 l.

5 La Figura 7 es un gráfico que muestra el efecto del pH sobre el crecimiento de ONC-T18 en condiciones de fermentación discontinua múltiple con alto contenido de glucosa.

La Figura 8 es un gráfico que muestra los perfiles de ácidos grasos de ONC-T18 cultivados en diferentes condiciones de pH y usando fermentación de múltiples lotes de alto contenido en glucosa.

10 La Figura 9 es un gráfico que muestra la contaminación reducida de un cultivo ONC-T18 en condiciones de pH bajo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

En el presente documento se proporcionan métodos para producir uno o más ácidos grasos poliinsaturados. Los métodos incluyen proporcionar un microorganismo *Thraustochytrium* capaz de producir ácidos grasos poliinsaturados, proporcionar un medio que comprende una o más fuentes de carbono, a un primer nivel de concentración superior a 200 g/l, cultivar el microorganismo *Thraustochytrium* en el medio hasta que el primer nivel de concentración de la fuente de carbono se reduzca de 0 a 20 g/l; añadir al medio una segunda concentración de una o más fuentes de carbono de más de 200 g/l; y cultivar el microorganismo en el medio en condiciones suficientes para producir el uno o más ácidos grasos poliinsaturados. Opcionalmente, el medio tiene un pH bajo.

El método es adecuado para reducir la contaminación de un cultivo no estéril que comprende uno o más microorganismos. El método incluye cultivar los microorganismos (i) en presencia de una alta concentración de una o más fuentes de carbono, y opcionalmente en combinación con condiciones (ii) de pH bajo, en donde el cultivo reduce la contaminación del cultivo no estéril que comprende los microorganismos. Opcionalmente, el método comprende cultivar los microorganismos en un recipiente abierto.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "pH bajo" o "pH reducido" se refiere a un valor de pH inferior al pH neutro. La expresión "pH bajo" generalmente se refiere a un valor de pH inferior a 4,5. Opcionalmente, pH bajo se refiere a un valor de 2 a 4,5, ambos inclusive, o cualquier valor entre 2 y 4,5. Opcionalmente, el pH es de 3 a 3,5. Se entiende que el pH de un cultivo puede cambiar con el tiempo, es decir, a lo largo del curso de la fermentación. Tal como se usa en el presente documento, cultivar el microorganismo en condiciones de pH bajo significa que el pH del cultivo o medio se monitoriza y ajusta con el tiempo para mantener el pH del cultivo a pH bajo.

35 Tal como se usa en el presente documento, la frase "alta concentración de una fuente de carbono" se refiere a una cantidad de la fuente de carbono de al menos 200 g/l. Por ejemplo, la concentración de la una o más fuentes de carbono puede ser de al menos 200 g/l o mayor de 200 g/l. Opcionalmente, la concentración de la una o más fuentes de carbono es de 200 g/l a 300 g/l. Opcionalmente, la concentración de la una o más fuentes de carbono es de 200 g/l a 250 g/l. Se entiende que la concentración de la fuente de carbono puede cambiar con el tiempo, es decir, a lo largo del curso de la fermentación. Tal como se usa en el presente documento, un medio que contiene una alta concentración de una fuente de carbono significa que el medio contiene al menos 200 g/l de la fuente de carbono. Tal como se usa en el presente documento, cultivar el microorganismo a una alta concentración de una fuente de carbono significa que la concentración inicial de la fuente de carbono en el cultivo o medio es de al menos 200 g/l. Como se describe con mayor detalle a continuación, la concentración de la fuente de carbono se puede monitorizar con el tiempo una o más veces y una vez que alcanza un determinado umbral, se puede añadir una cantidad adicional de una fuente de carbono al cultivo o medio. En este caso, la cantidad adicional de la fuente de carbono es una alta concentración de una fuente de carbono, es decir, al menos 200 g/l de la fuente de carbono.

Por lo tanto, se proporciona un método para cultivar uno o más *Thraustochytrium*. Los métodos incluyen cultivar los microorganismos en un medio que comprende una primera cantidad de una o más fuentes de carbono a un primer nivel de concentración, monitorizar una concentración de fuentes de carbono hasta que la concentración de fuentes de carbono se reduzca por debajo del primer nivel de concentración y añadir al medio una segunda cantidad de una o más fuentes de carbono para aumentar la concentración de fuentes de carbono a un segundo nivel de concentración. Los niveles de concentración primero y segundo de la una o más fuentes de carbono son mayores de 200 g/l. La segunda cantidad de la una o más fuentes de carbono se añade al medio cuando el nivel de concentración de la fuente de carbono se reduce de 0 a 20 g/l. Los métodos proporcionados pueden incluir rondas repetidas de monitorización y adiciones de fuentes de carbono, según se desee. Por lo tanto, los métodos proporcionados pueden incluir, después de la adición de la segunda cantidad de la una o más fuentes de carbono, (a) cultivar los microorganismos hasta que la concentración de la fuente de carbono de la una o más fuentes de carbono se reduzca por debajo del segundo nivel de concentración y (b) añadir al medio una tercera cantidad de una o más fuentes de carbono para aumentar la concentración de la fuente de carbono a un tercer nivel de concentración. Opcionalmente, el tercer nivel de concentración de la una o más fuentes de carbono es mayor de 200 g/l. Opcionalmente, la tercera cantidad de la una o más fuentes de carbono se añade al medio cuando el nivel de concentración de la fuente de carbono se reduce de 0 a 20 g/l. Opcionalmente, los métodos incluyen, después de la adición de la tercera cantidad de la una o más fuentes de carbono, (a) cultivar los microorganismos hasta que la concentración de la fuente de carbono de la una o más

fuentes de carbono se reduzca por debajo del tercer nivel de concentración y (b) añadir al medio una cuarta cantidad de una o más fuentes de carbono para aumentar la concentración de la fuente de carbono a un cuarto nivel de concentración. Opcionalmente, el cuarto nivel de concentración de la una o más fuentes de carbono es mayor de 200 g/l. Opcionalmente, la cuarta cantidad de la una o más fuentes de carbono se añade al medio cuando el nivel de concentración de la fuente de carbono se reduce de 0 a 20 g/l. Opcionalmente, la una o más fuentes de carbono en la primera, segunda, tercera y cuarta cantidades son iguales.

En los métodos proporcionados, la concentración de fuente de carbono se puede controlar una o más veces. Opcionalmente, la concentración de la fuente de carbono se puede monitorizar continuamente (por ejemplo, usando un dispositivo que monitoriza continuamente las concentraciones de la fuente de carbono (por ejemplo, glucosa) en un medio) o periódicamente (por ejemplo, eliminando una muestra de medio y probando la concentración de la fuente de carbono en la muestra). Opcionalmente, la concentración de la fuente de carbono se controla o determina antes y/o después de la adición de una cantidad de la una o más fuentes de carbono. Por lo tanto, por ejemplo, los métodos proporcionados pueden incluir la monitorización de la concentración de la fuente de carbono una o más veces entre adiciones de las cantidades de la una o más fuentes de carbono. Opcionalmente, los métodos proporcionados incluyen monitorizar o determinar la concentración de la fuente de carbono antes de añadir una cantidad de una o más fuentes de carbono, después de la adición de una cantidad de una o más fuentes de carbono y una o más veces antes de la adición de una cantidad adicional de una o más fuentes de carbono. A modo de ejemplo, los métodos proporcionados pueden incluir la monitorización de la concentración de la fuente de carbono después de la adición de una primera cantidad de la una o más fuentes de carbono y, opcionalmente, una o más veces antes de la adición de una segunda cantidad de la una o más fuentes de carbono. Los métodos proporcionados pueden incluir la monitorización de la concentración de la fuente de carbono después de la adición de la segunda cantidad de la una o más fuentes de carbono y, opcionalmente, una o más veces antes de la adición de una tercera cantidad de la una o más fuentes de carbono. Los métodos proporcionados pueden incluir la monitorización de la concentración de la fuente de carbono después de la adición la tercera cantidad de la una o más fuentes de carbono y, opcionalmente, una o más veces antes de la adición de una cuarta cantidad de la una o más fuentes de carbono. Opcionalmente, en los métodos proporcionados, la concentración de la fuente de carbono se controla una vez entre cada adición de las cantidades de la una o más fuentes de carbono. A modo de ejemplo, la concentración de la fuente de carbono se monitoriza después de la adición de la primera cantidad de la una o más fuentes de carbono y antes de la adición de la segunda cantidad de la una o más fuentes de carbono una vez. De forma similar, la concentración de la fuente de carbono se puede monitorizar después de la adición de la segunda cantidad de la una o más fuentes de carbono y antes de la adición de la tercera cantidad de la una o más fuentes de carbono una vez. Opcionalmente, la concentración de la fuente de carbono se controla una vez antes de la adición de la segunda cantidad de la una o más fuentes de carbono, independientemente del número de adiciones adicionales de cantidades de la una o más fuentes de carbono.

La concentración o los niveles de la fuente de carbono pueden controlarse directa o indirectamente por cualquier medio conocido por los expertos en la materia. Opcionalmente, la concentración de la fuente de carbono se controla midiendo los niveles de oxígeno disuelto, por ejemplo, en el medio o en una muestra del medio. Opcionalmente, la monitorización incluye obtener una muestra del medio y determinar la concentración de la fuente de carbono en la muestra. Opcionalmente, la etapa de determinar la concentración de la fuente de carbono comprende un ensayo colorimétrico, basado en enzimas o de fluorescencia. Opcionalmente, la etapa de determinar la concentración de la fuente de carbono incluye la cromatografía de líquidos a alta presión (HPLC).

I. MICROORGANISMOS

Los métodos descritos en el presente documento incluyen la extracción de lípidos de una población de microorganismos. Los microorganismos son del género *Thraustochytrium*. Los *Thraustochytriales* se describen en las Patentes de Estado Unidos N.º. 5.340.594 y 5.340.742. Los microorganismos son especies de *Thraustochytrium*, tales como las especies de *Thraustochytrium* depositadas como número de registro de ATCC PTA-6245 (es decir, ONC-T18) como se describe en la Patente de Estados Unidos número 8.163.515. Por lo tanto, el microorganismo puede tener una secuencia de ARNr 18s que es al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % o más (p.ej., incluido un 100 %) idéntica a la SEQ ID NO:1.

Los microorganismos para su uso en los métodos descritos en el presente documento pueden producir una variedad de compuestos lipídicos. Los lípidos insaturados producidos por el método de la invención son lípidos poliinsaturados (es decir, lípidos que contienen al menos 2 enlaces carbono-carbono insaturados, por ejemplo, enlaces dobles) o lípidos altamente insaturados (es decir, lípidos que contienen 4 o más enlaces carbono-carbono insaturados). Ejemplos de lípidos insaturados incluyen ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y/u omega-6, tal como el ácido docosahexaenoico (es decir, DHA), ácido eicosapentaenoico (es decir, EPA) y otros compuestos insaturados, poliinsaturados y altamente insaturados de origen natural.

II. PROCESOS

Fermentación

Los métodos proporcionados incluyen o pueden usarse junto con etapas adicionales para cultivar microorganismos de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Las especies de *Thraustochytrium*, se pueden cultivar de acuerdo con los métodos descritos en la publicación 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 el presente documento. Opcionalmente, el medio suministra varios componentes nutricionales, incluyendo una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno, para el microorganismo.

El medio para el cultivo de Traustocítridos puede incluir cualquiera de una variedad de fuentes de carbono. Ejemplos de fuentes de carbono incluyen ácidos grasos, lípidos, glicerol, triglicéridos, carbohidratos, polioles, aminoazúcares y cualquier tipo de biomasa o flujo de desechos. Los ácidos grasos incluyen, por ejemplo, ácido oleico. Los carbohidratos incluyen, pero sin limitación, glucosa, celulosas, hemicelulosas, fructosa, dextrosa, xilosa, lactulosa, galactosa, maltotriosa, maltosa, lactosa, glucógeno, gelatina, almidón (maíz o trigo), acetato, m-inositol (p. ej., derivado de extracto soluble de maíz), ácido galacturónico (p.ej., derivado de pectina), L-fucosa (p. ej., derivada de galactosa), gentiobiosa, glucosamina, alfa-D-glucosa-1-fosfato (p. ej., derivado de glucosa), celobiosa, dextrina, alfa-ciclodextrina (por ejemplo, derivada de almidón) y sacarosa (por ejemplo, de melazas). Los polioles incluyen, pero sin limitación, maltitol, eritritol y adonitol. Los aminoazúcares incluyen, pero sin limitación, N-acetil-D-galactosamina, N-acetil-D-glucosamina y N-acetil-beta-D-manosamina. Opcionalmente, la fuente de carbono es glucosa. Tal como se indica anteriormente, en los métodos proporcionados, la fuente de carbono se proporciona a una concentración de más de 200 g/l.

Opcionalmente, los microorganismos proporcionados en el presente documento se cultivan en condiciones que aumentan la biomasa y/o la producción de un compuesto de interés (por ejemplo, contenido de aceite o ácidos grasos totales (TFA, por sus siglas en inglés)). Los taustocítridos, por ejemplo, se cultivan generalmente en medio salino. Opcionalmente, los taustocítridos se pueden cultivar en un medio que tiene una concentración de sal de aproximadamente 2,0 g/l a aproximadamente 50,0 g/l. Opcionalmente, los taustocítridos se cultivan en un medio que tiene una concentración de sal de aproximadamente 2 g/l a aproximadamente 35 g/l (por ejemplo, de aproximadamente 18 g/l a aproximadamente 35 g/l). Opcionalmente, los taustocítridos descritos en el presente documento pueden crecer en condiciones bajas en sal. Por ejemplo, los taustocítridos pueden cultivarse en un medio que tiene una concentración de sal de aproximadamente 5 g/l a aproximadamente 20 g/l (por ejemplo, de aproximadamente 5 g/l a aproximadamente 15 g/l). El medio de cultivo opcionalmente incluye NaCl. Opcionalmente, el medio incluye sal marina natural o artificial y/o agua de mar artificial.

El medio de cultivo puede incluir sales de sodio que no contienen cloruro (por ejemplo, sulfato de sodio) como fuente de sodio. Por ejemplo, una porción significativa del sodio total puede suministrarse por sales sin cloruro de manera que menos del 100 %, 75 %, 50 % o 25 % del sodio total en medio de cultivo es suministrado por cloruro de sodio.

Opcionalmente, el medio de cultivo tiene concentraciones de cloruro de menos de aproximadamente 3 g/l, 500 mg/l, 250 mg/l o 120 mg/l. Por ejemplo, el medio de cultivo para su uso en los métodos proporcionados puede tener concentraciones de cloruro de entre e incluyendo 60 mg/l y 120 mg/l.

Ejemplos de sales de sodio sin cloruro adecuadas para su uso de acuerdo con los presentes métodos incluyen, pero sin limitación, ceniza de sosa (una mezcla de carbonato de sodio y óxido de sodio), carbonato de sodio, bicarbonato sódico, sulfato de sodio y mezclas de los mismos. Véanse, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. N.º 5.340.742 y 6.607.900, cuyos contenidos completos se incorporan en el presente documento por referencia.

El medio para el cultivo de Traustocítridos puede incluir cualquiera de una variedad de fuentes de nitrógeno. Fuentes de nitrógeno ejemplares incluyen soluciones de amonio (por ejemplo, NH_4 en H_2O), sales de amonio o amina (p.ej., $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, NH_4NO_3 , $\text{NH}_4\text{OOCCH}_2\text{CH}_3$ (NH_4Ac)), 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 un medio adecuado generalmente varían entre e incluyendo aproximadamente 1 g/l y aproximadamente 25 g/l.

El medio opcionalmente incluye un fosfato, tales como fosfato de potasio o fosfato de sodio. Las sales inorgánicas y oligoelementos en el medio pueden incluir sulfato de amonio, bicarbonato sódico, ortovanadato sódico, cromato potásico, molibdato sódico, 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. Se pueden incluir vitaminas tales como el 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 entre e incluyendo 3,0 y 10,0, usando ácido o base, cuando sea apropiado, y/o usando la fuente de nitrógeno. Opcionalmente, el medio se ajusta a un pH bajo como se define anteriormente. El medio se puede esterilizar.

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 analiza en el presente documento, un medio sólido puede contener uno o más componentes (por ejemplo, agar o agarosa) que proporcionan soporte estructural y/o permiten que el medio esté en forma sólida.

- 5 Las células se pueden cultivar desde 1 día hasta 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 lleva a cabo opcionalmente a temperaturas de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 30 °C, por ejemplo, de aproximadamente 18 °C a aproximadamente 28 °C. El cultivo puede incluir cultivo de agitación por aireación, cultivo de agitación, cultivo estacionario, cultivo discontinuo, cultivo semicontinuo, cultivo continuo, cultivo discontinuo rodante, cultivo por ondas o similares. El cultivo puede realizarse usando un fermentador de agitación convencional, un fermentador de columna de burbujas (cultivos discontinuos o continuos), un fermentador de ondas, etc.
- 10
- 15 Los cultivos pueden airearse por uno o más de una variedad de métodos, incluida la agitación. Opcionalmente, la agitación varía de aproximadamente 100 rpm a aproximadamente 1000 rpm, por ejemplo, de aproximadamente 350 rpm a aproximadamente 600 rpm o de aproximadamente 100 a aproximadamente 450 rpm. Opcionalmente, los cultivos se airean usando diferentes velocidades de agitación durante las fases de producción de biomasa y durante las fases de producción de lípidos. Como alternativa o adicionalmente, las velocidades de agitación pueden variar según el tipo de recipiente de cultivo (por ejemplo, la forma o el tamaño del matraz).

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 OD son menores que la cantidad de oxígeno disuelto en la fase de producción de biomasa).

- 25 Opcionalmente, el nivel de oxígeno disuelto se reduce por debajo de la saturación. Por ejemplo, el nivel de oxígeno disuelto puede reducirse a un nivel muy bajo, o incluso indetectable.

La producción de lípidos deseables puede potenciarse cultivando células de acuerdo con métodos que implican un cambio de una o más condiciones de cultivo para obtener mayores cantidades de compuestos deseables.

- 30 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 las mismas. Opcionalmente, se realiza un cultivo en dos etapas en el que una primera etapa favorece la producción de biomasa (p. ej., utilizando condiciones de alto contenido de oxígeno (p. ej., en general 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).
- 35

Pasteurización

- 40 Opcionalmente, la biomasa resultante se pasteuriza para inactivar las sustancias no deseables presentes en la biomasa. Por ejemplo, la biomasa se puede pasteurizar para inactivar sustancias degradadoras de compuestos. La biomasa puede estar presente en el medio de fermentación o aislada del medio de fermentación para la etapa de pasteurización. La etapa de pasteurización se puede realizar calentando la biomasa y/o el medio de fermentación a una temperatura elevada. Por ejemplo, la biomasa y/o el medio de fermentación se pueden calentar a una temperatura de aproximadamente e incluyendo 50 °C a aproximadamente e incluyendo 95 °C (por ejemplo, de aproximadamente e incluyendo 55 °C a aproximadamente e incluyendo 90 °C o de aproximadamente e incluyendo 65 °C a aproximadamente e incluyendo 80 °C). Opcionalmente, la biomasa y/o el medio de fermentación se pueden calentar desde aproximadamente 30 minutos hasta aproximadamente e incluyendo 120 minutos (por ejemplo, desde aproximadamente e incluyendo 45 minutos hasta aproximadamente e incluyendo 90 minutos, o desde aproximadamente e incluyendo 55 minutos hasta aproximadamente e incluyendo 75 minutos). La pasteurización se puede realizar utilizando un medio de calentamiento adecuado como el que conocen los expertos en la materia, tal como por inyección directa de vapor.
- 45
- 50

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

55

Cosecha y Lavado

Opcionalmente, la biomasa puede cosecharse de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, la biomasa se puede recoger opcionalmente del medio de fermentación usando varios métodos convencionales, tal como centrifugación (p. ej., centrifugadoras de eyección de sólidos) o filtración (p. ej., filtración de flujo cruzado) y también puede 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
- 65 Opcionalmente, la biomasa se lava con agua. Opcionalmente, la biomasa se puede concentrar hasta aproximadamente e incluyendo un 20 % de sólidos. Por ejemplo, la biomasa se puede concentrar hasta

aproximadamente e incluyendo un 5 % hasta aproximadamente e incluyendo un 20 % de sólidos, desde aproximadamente e incluyendo un 7,5 % hasta aproximadamente e incluyendo un 15 % de sólidos, o desde aproximadamente e incluyendo un 15 % de sólidos hasta aproximadamente e incluyendo un 20 % de sólidos, o cualquier porcentaje dentro de los intervalos citados. Opcionalmente, la biomasa se puede concentrar a aproximadamente un 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 % 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 % de sólidos o menos, aproximadamente 2 % de sólidos o menos o aproximadamente 1 % de sólidos o menos.

Aislamiento y Extracción

Los métodos proporcionados, opcionalmente, incluyen aislar los ácidos grasos poliinsaturados de la biomasa o microorganismos utilizando métodos conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, los métodos para aislar ácidos grasos poliinsaturados se describen en la Patente de Estados Unidos N.º 8.163.515. Opcionalmente, el medio no se esteriliza antes del aislamiento de los ácidos grasos poliinsaturados. Opcionalmente, la esterilización comprende un aumento de temperatura. Opcionalmente, los ácidos grasos poliinsaturados producidos por los microorganismos y aislados a partir de los métodos proporcionados son ácidos grasos de cadena media. Opcionalmente, el uno o más ácidos grasos poliinsaturados se seleccionan del grupo que consiste en ácido alfa linolénico, ácido araquidónico, ácido docosaheptaenoico, ácido docosapentaenoico, ácido eicosapentaenoico, ácido gamma-linolénico, ácido linoleico, ácido linolénico y combinaciones de los mismos.

III. PRODUCTOS

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) y otros lípidos producidos de acuerdo con el método descrito en el presente documento pueden utilizarse en cualquiera de una variedad de aplicaciones, por ejemplo, explotando sus propiedades biológicas o nutricionales. Opcionalmente, los compuestos pueden usarse en productos farmacéuticos, suplementos alimenticios, aditivos para piensos animales, cosméticos y similares. Opcionalmente, los PUFA y otros lípidos se usan para producir combustible, por ejemplo, biocombustible. Los lípidos producidos de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento también pueden usarse como intermedios en la producción de otros compuestos.

Opcionalmente, los lípidos producidos de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento pueden incorporarse en un producto final (por ejemplo, un alimento o suplemento alimenticio, una fórmula infantil, un producto farmacéutico, un combustible, etc.) Los alimentos o suplementos alimenticios adecuados para incorporar los lípidos descritos en el presente documento incluyen bebidas tales como leche, agua, bebidas deportivas, bebidas energéticas, té y zumos; dulces tal como gelatinas y galletas; alimentos y bebidas que contienen grasa tal como productos lácteos; productos alimenticios procesados como arroz blando (o gachas); fórmulas infantiles; cereales para el desayuno; o similares. Opcionalmente, uno o más lípidos producidos pueden incorporarse en un suplemento dietético, tales como, por ejemplo, un multivitamínico. Opcionalmente, un lípido producido de acuerdo con el método descrito en el presente documento puede incluirse en un suplemento dietético y opcionalmente puede incorporarse directamente en un componente de alimento o pienso (por ejemplo, un suplemento alimenticio).

Ejemplos de piensos en los que se pueden incorporar los lípidos producidos por los métodos descritos en el presente documento incluyen alimentos para mascotas tales como alimentos para gatos; alimentos para perros y similares; alimentos para peces de acuario, peces o crustáceos cultivados, etc.; piensos para animales criados en granjas (incluyendo ganado y peces o crustáceos criados en acuicultura). El material alimenticio y para piensos en el que se pueden incorporar los lípidos producidos de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento es preferentemente agradable al organismo que es el receptor previsto. Este material alimenticio y para piensos puede tener cualquier propiedad física conocida actualmente para un material alimenticio (por ejemplo, sólido, líquido, blando).

Opcionalmente, uno o más de los compuestos producidos (p. ej., PUFA) se pueden incorporar a un producto farmacéutico. 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 sutiles, polvos, comprimidos, píldoras, trociscos o similares.

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

mismos.

Los ejemplos a continuación tienen la intención de ilustrar adicionalmente determinados aspectos de los métodos descritos en el presente documento, y no tienen la intención de limitar el alcance de las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1. Fermentación discontinua múltiple de alto contenido de glucosa de microorganismos para la producción de aceite.

Durante el desarrollo del proceso de fermentación de los presentes inventores, basado en ONC-T18, el cultivo pudo sobrevivir a una concentración extremadamente alta de glucosa en el medio de fermentación (hasta 250 g/l). Dicha observación ha llevado al desarrollo de procesos de fermentación con una concentración de glucosa inicial intencionalmente alta y altas dosis de glucosa durante la fermentación.

Por lo tanto, como se describe en el presente documento, se desarrollaron procesos exclusivos de fermentación de aceite por microorganismos. Se emplearon estrategias que incluían una alta concentración inicial (hasta 250 g/l) de glucosa en el suministro de glucosa en dosis medias y altas durante la fermentación para lograr un rápido crecimiento del cultivo y producción de aceite. Dicha estrategia de suministro de fuentes de carbono proporciona una alternativa más simple pero altamente eficaz a las estrategias de alimentación continua con carbono empleadas por los procesos tradicionales de fermentación discontinua alimentada. El potencial de contaminación por organismos extraños se redujo en gran medida debido a la alta presión osmótica creada por la alta concentración de sustratos de carbono. Dicha estrategia de fermentación también se aplicó a las fermentaciones de una cepa de algas representativa de producción de aceite, *Schizochytrium sp.* ATCC20888. Sin embargo, no se pudo lograr un crecimiento de cultivo significativo en condiciones de alto contenido de glucosa. Por lo tanto, se demostró que puede ser un rasgo exclusivo de ONC-T18, así como de algunos otros microorganismos, para hacer frente a una concentración tan alta de fuente de carbono.

Se llevaron a cabo fermentaciones con alto contenido de glucosa de ONC-T18 a diferentes escalas de fermentador con la misma composición de medio y estrategia de suministro de glucosa. Los fermentadores utilizados fueron 2 litros (l), 5 l y 30 l con un volumen de trabajo de aproximadamente 1,7 l, 4 l y 25 l, respectivamente. La composición del medio y la estrategia de suministro de glucosa se detallan en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1. Composición de medio y estrategia de suministro de glucosa durante fermentaciones discontinuas múltiples de alto contenido de glucosa de ONC-T18

		Fermentador 2 l	Fermentador 5 l	Fermentador 30 l
Volumen inicial		1.3L	3.5L	25L
Volumen final		1.7L	4.5L	25L
Medio inicial	Glucosa	242 g/l	230 g/l	204 g/l
	Peptona de soja	2 g/l	2 g/l	2 g/l
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	4 g/l	4 g/l	4 g/l
	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,005 g/l	0,005 g/l	0,005 g/l
	Solución de oligoelementos (madre)	1,5 ml/l	1,5 ml/l	1,5 ml/l
	KH ₂ PO ₄	2,2 g/l	2,2 g/l	2,2 g/l
	K ₂ HPO ₄	2,4 g/l	2,4 g/l	2,4 g/l
	(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g/l	20 g/l	20 g/l
	Solución de vitaminas (madre)	3 g/l	3 g/l	3 g/l
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,1 g/l	0,1 g/l	0,1 g/l
Base	solución de NaOH 5M	Según sea necesario		
Ácido	solución de H ₂ SO ₄ 2M	Según sea necesario		
Suministro de glucosa durante la fermentación		Durante la fermentación cuando la glucosa en el medio estaba cerca del agotamiento, se añadieron dosis de alto contenido de glucosa para llevar la concentración de glucosa acuosa a entre 150 g/l y 250 g/l; no se realizó una adición continua de glucosa entre cada dosis de alto contenido de glucosa		

Las Figuras 1 a 3 son gráficos que muestran el perfil temporal de la concentración de células ONC-T18 (biomasa) y la producción total de ácidos grasos (% de TFA), utilizando diferentes escalas de fermentadores. Al contrario de lo que

se ha informado sobre varios microorganismos a altas concentraciones de carbono, ONC-T18 pudo crecer muy rápido en estas duras condiciones de crecimiento y su biomasa podría aumentar hasta 230 g/l durante cuatro a cinco días de fermentación. El contenido final de grasa total podría alcanzar el 70 % en todas las escalas de fermentación probadas, cumpliendo o superando las informadas en la bibliografía para fermentaciones de aceite de células individuales.

5

Para investigar si la capacidad de cultivar y producir aceite a altas concentraciones de carbono es un rasgo exclusivo de la cepa ONC-T18 y cepas altamente relacionadas, se utilizó una cepa ATCC20888 de *Schizochytrium sp.* de microalgas representativa de producción de aceite para realizar fermentaciones en paralelo con ONC-T18. En el primer experimento de fermentación paralela, ambas cepas se cultivaron en fermentadores de 2 l usando una fórmula de medio que era la misma que la enumerada en la Tabla 1, con una concentración de glucosa inicial de 188 g/l en el fermentador de ONC-T18 y 193 g/l en el fermentador de ATCC20888. No se suministró glucosa adicional al fermentador de ATCC20888 durante la fermentación, ya que no se había producido un consumo significativo de glucosa inicial. Como se muestra en la Figura 4, la cepa ATCC20888 de *Schizochytrium sp.* no pudo hacer frente a una concentración inicial de glucosa tan alta en el medio y, por lo tanto, tuvo poco crecimiento en términos de biomasa total.

Para confirmar que la incapacidad de ATCC20888 para crecer en condiciones de alto contenido de glucosa no se debió a la composición especial del medio de fermentación de aceite de algas de ONC, se realizó otro conjunto de fermentaciones paralelas en fermentadores de 2 l. Durante este experimento, ONC-T18 todavía se cultivó utilizando la fórmula de medio de ONC, mientras que ATCC20888 se cultivó utilizando una fórmula de medio adaptada de la patente de EE. UU. N.º 6.607.900 de Bailey et al. Debido a limitaciones de tiempo, solo se proporcionó glucosa inicial (258 g/l en el fermentador de ONC-T18 y 211 g/l en el fermentador de ATCC20888) y ambas fermentaciones se terminaron antes de que se agotara la glucosa (Fig. 5). Incluso con una fórmula de medio que se desarrolló específicamente para la cepa ATCC20888, el alto contenido de glucosa inicial aún presentaba una condición demasiado dura para que el cultivo creciera significativamente.

Como se ha demostrado por las fermentaciones anteriores, la principal diferencia entre la fermentación discontinua alimentada tradicional y el proceso de fermentación recientemente desarrollado fue la alta concentración de glucosa al comienzo y también durante el curso de la fermentación. El nuevo proceso comienza con aproximadamente 200 g/l de glucosa (en comparación con 60 g/l de glucosa de procesos anteriores) y cantidades suficientes de otros nutrientes (por ejemplo, nitrógeno en forma de sulfato de amonio, fósforo en forma de fosfato de potasio). Una vez que la glucosa se agota o casi se agota, como se detecta mediante un análisis rápido de glucosa de una muestra fuera, se agrega otra dosis alta de glucosa a la vez para elevar la concentración de glucosa en el medio de fermentación a alrededor de 200 g/l. Por lo tanto, después de cada vez de adición de glucosa en dosis altas, la fermentación se realizó en modo discontinuo con alto contenido de glucosa. Dichos ciclos de adición de glucosa y operación discontinua se repiten hasta que la producción de aceite alcanza los límites fisiológicos del cultivo, o el crecimiento/producción está limitado por otras condiciones de fermentación, tal como el suministro de oxígeno disuelto, que está determinado por los factores de diseño de un sistema de fermentación particular. Tal estrategia de suministro de carbono simplifica enormemente la monitorización y control del proceso de fermentación de aceite de algas. Esto se evidencia en la Tabla 2 que muestra la validación de este proceso en 2 l a 10 l. Tal como se muestra en la Tabla 2, con un ciclo de 4 a 6 días, la biomasa puede alcanzar 200 a 230 g/l con un contenido total de ácidos grasos que alcanza aproximadamente un 70 %.

Tabla 2. Validación de la estrategia discontinua múltiple de alto contenido de glucosa en cultivos de 2 l a 10 l.

Número de Lote	Tiempo de lote	Biomasa	tfa	mfa
2011-2L-1	102 h	227 g/l 2,22 g/lh	69 % 156 g/l 1,53 g/lh	56 % 88 g/l 0,86 g/lh
2011-5L-1	136 h	237 g/l 1,74 g/lh	69 % 163 g/l 1,20 g/lh	68 % 110 g/l 0,81 g/lh
2012-10L-3	135 h	193 g/l 1,43 g/lh	77 % 149 g/l 1,10 g/lh	57 % 86 g/l 0,63 g/lh
2012-10L-6	119 h	191 g/l 1,61 g/lh	67 % 128 g/l 1,08 g/lh	66 % 84 g/l 0,71 g/lh
2012-10L-4	162 h	227 g/l 1,41 g/lh	70 % 159 g/l 0,98 g/lh	60 % 96 g/l 0,59 g/lh

45

Otra ventaja de dicha fermentación con alto contenido en glucosa es la ventaja competitiva presentada por la alta presión osmótica, que pocos microorganismos pueden soportar, lo que da como resultado una menor contaminación. Durante las dos fermentaciones, la glucosa adicional, además de los 200 g/l de glucosa inicial, se añadió en forma no

estéril. No se observó contaminación.

Ejemplo 2. Proceso de fermentación no estéril para el cultivo de microorganismos para la producción de aceite.

5

Un coste significativo para la fermentación a escala industrial incluye aquellos asociados con la esterilización. Los costes incluyen el gasto de los fermentadores de recipientes a presión y los sistemas de vapor en sitio, así como los costes operativos asociados con la generación de vapor. Una forma de reducir estos costos es fermentar cultivos en condiciones no estériles. Sin embargo, las condiciones no estériles son problemáticas para la mayoría de los microorganismos debido a la contaminación del cultivo, por ejemplo, por bacterias.

10

Para investigar las condiciones no estériles en las que pueden crecer ONC-T18 y microorganismos similares, se preparó un medio sin extracto de levadura o peptona de soja. La Tabla 3 enumera los componentes del medio. El pH se controló durante toda la fermentación a 4,5 usando hidróxido de sodio (5N). La temperatura no se controló y se utilizó un suministro de glucosa del 75 % durante la fermentación.

15

Tabla 3. Componentes del medio inicial. No se hicieron otras adiciones a la fermentación, excepto NaOH y ácido fosfórico para controlar el pH.

Ingredientes	Cantidad (por litro)
Extracto de Levadura de Himedia	0 g/l
Peptona de Soja de Himedia	0 g/l
Glucosa inicial	60 g/l
NaCl	9 g/l
Sulfato de amonio	20 g/l
Fosfato monopotásico	2 g/l
Sulfato magnésico	4 g/l
Cloruro de calcio (solución)	0,5 ml/l
FeCl ₃ 6H ₂ O (solución)	0,5 ml/l
TES (solución)	1,5 ml/l
Vitaminas (solución)	3 ml/l

20 El aire se suministró por un tubo de silicona sin burbujeador. El impulsor era una hidroala de estilo Lightnin A310 (flujo axial). El recipiente superior abierto era un frasco con la parte superior retirada. El pH se controló por el sistema de control Sartorius PH en el Biostat B (Sartorius Corporation, Bohemia, NY). No hubo control de temperatura. La tasa de acumulación de grasa durante la duración de la fermentación fue de 0,5 g/l/h y la tasa de acumulación de DHA fue de 0,23 g/l/h. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

25

Tabla 4. Resultados finales de la fermentación superior abierta.

Tiempo (horas)	Biomasa (g/l)	Ácidos Grasos Totales (g/l)	DHA (g/l)
161,4	139	79	38

Durante una ejecución de escala piloto de 500 l, se detectó contaminación bacteriana en la hora de registro 8. Se determinó por PCR que la contaminación era en el género *Bacillus*. Los componentes del medio se muestran en la

30 Tabla 5.

Tabla 5. Componentes del medio.

Ingredientes	Cantidad (por litro)
Peptona de Soja de Himedia	10 g/l
Glucosa inicial	60 g/l
NaCl	9 g/l
Sulfato de amonio	10 g/l
Fosfato potásico	2,2 g/l
Fosfato potásico	2,4 g/l
Sulfato magnésico	4 g/l
Cloruro de calcio (solución)	0,5 ml/l
FeCl ₃ 6H ₂ O (solución)	0,5 ml/l
TES (solución)	1,5 ml/l
Vitaminas (solución)	3 ml/l

Las bacterias se contaron usando un hemocitómetro, y su concentración se calculó como la unidad de recuento celular por ml de medio. La población de bacterias dejó de aumentar cuando el pH se redujo a 3,3. Sin embargo, incluso a pH bajo, el cultivo de ONC-T18 continuó creciendo como se muestra en la Figura 9. Los resultados se muestran en la Tabla 6. Se observa que si este experimento se iniciara a pH 3,3 en lugar de pH 6,5, no se habría observado

35

contaminación bacteriana.

Tabla 6. Resultados finales del ensayo de fermentación.

Tiempo (horas)	Biomasa (g/l)	Ácidos Grasos Totales (g/l)	DHA (g/l)
198	148	103	34

- 5 Después se probaron diferentes valores de pH para determinar su efecto sobre el microorganismo, de manera específica, a valores de pH de 6,5, 4,5 y 3,2. ONC-T18 actuó muy bien incluso en condiciones muy ácidas. Los resultados se muestran en las Figuras 7 y 8. Las fermentaciones para las Figuras 7 y 8 se llevaron a cabo utilizando una estrategia de alimentación discontinua múltiple con alto contenido de glucosa como se describe en el Ejemplo 1.
- 10 Por lo tanto, se demuestra en el presente documento que ONC-T18 y microorganismos similares se pueden fermentar o cultivar en condiciones de alto estrés, por ejemplo, con alto contenido de glucosa alta (y por lo tanto, elevada presión osmótica) y/o a pH bajo para reducir los costes de producción de aceite y reducir la contaminación.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 15 <110> Mara Renewables Corporation
- <120> métodos de producción de aceite en microorganismos
- 20 <130> 95523-943400-003W01
- <150> 62/001.912
- <151> 22/05/2014
- 25 <160> 1
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 30 <211> 1723
- <212> ADN
- <213> Thraustochytrium sp.
- <400> 1
- 35

ES 2 774 452 T3

gtagtcatac gctcgtctca aagattaagc catgcatgtg taagtataag cgattataact	60
gtgagactgc gaacggctca ttatatcagt tatgatttct tcggtatddd ctttatatgg	120
atacctgcag taattctgga attaatacat gctgagaggg ccgactgtt cgggagggcc	180
gcacttatta gagttgaagc caagtaagat ggtgagtcac gataattgag cagatcgctt	240
gtttggagcg atgaatcggt tgagtttctg ccccatcagt tgcgcacggg agtgtattgg	300
actacgggtga ctataacggg tgacggggag ttagggctcg actccggaga gggagcctga	360
gagacggcta ccacatccaa ggaaggcagc aggcgcgtaa attaccaat gtggactcca	420
cgaggtagtg acgagaaata tcaatgcggg gcgcttcgag tcttgctatt ggaatgagag	480
caatgtaaaa ccctcatcga ggatcaactg gagggcaagt ctggtgccag cagccgcggt	540
aattccagct ccagaagcgt atgctaaagt tgttgcagtt aaaaagctcg tagttgaatt	600
tctggggcgg gagccccggt ctttgcgcga ctgcgctctg tttgcgcagc ggctcctctg	660
ccatcctcgc ctcttttttt agtggcgtcg ttactgttaa ttaaagcaga gtgttccaag	720
caggtcgtat gacctggatg tttattatgg gatgatcaga tagggctcgg gtgctatddd	780
gttggtttgc acatctgagt aatgatgaat aggaacagtt gggggtattc gtattdtagga	840
gctagaggtg aaattcttgg atttccgaaa gacgaactac agcgaaggca tttaccaagc	900
atgttttcat taatcaagaa cgaaagtctg gggatcgaag atgattagat accatcgtag	960
tctagaccgt aaacgatgcc gacttgcgat tgcgggggtg ttgtattgga ccctcgcagc	1020
agcacatgag aaatcaaagt ctttgggttc cggggggagt atggtcgcaa ggctgaaact	1080
taaaggaatt gacggaaggg caccaccagg agtggagcct gcggcttaat ttgactcaac	1140
acgggaaaac ttaccaggtc cagacatagg taggattgac agattgagag ctctttcttg	1200
attctatggg tgggtggtgca tggccgttct tagttggtgg agtgatttgt ctggttaatt	1260
ccgttaacga acgagacctc ggcctactaa atagcgggtg gtatggcgac atacttgcgt	1320
acgcttctta gagggacatg ttcggtatac gagcaggaag ttcgaggcaa taacagggtct	1380
gtgatgccct tagatgttct gggccgcacg cgcgctacac tgatgggttc aacgggtggt	1440
catcgttggt cgcagcgagg tgctttgccg gaaggcatgg caaatccttt caacgccccat	1500
cgtgctgggg ctagattdtt gcaattatta atctccaacg aggaattcct agtaaacgca	1560
agtcacagc ttgcattgaa tacgtccctg ccctttgtac acaccgcccg tcgcacctac	1620
cgattgaacg gtccgatgaa accatgggat gaccttttga gcgtttgttc gcgagggggg	1680
tcagaactcg ggtgaatctt attgtttaga ggaagggtgaa gtc	1723

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir uno o más ácidos grasos poliinsaturados, comprendiendo el método:
 - 5 (a) proporcionar un microorganismo *Thraustochytrium* capaz de producir ácidos grasos poliinsaturados;
 - (b) proporcionar un medio que comprende una o más fuentes de carbono a un primer nivel de concentración superior a 200 g/L;
 - (c) cultivar el microorganismo *Thraustochytrium* en el medio hasta que el primer nivel de concentración de la fuente de carbono se reduzca de 0 a 20 g/L;
 - 10 (d) añadir al medio una segunda concentración de una o más fuentes de carbono de más de 200 g/L; y
 - (e) cultivar el microorganismo *Thraustochytrium* en el medio en condiciones suficientes para producir el uno o más ácidos grasos poliinsaturados.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el microorganismo tiene el número de registro de ATCC PTA-6245.
- 15 3. El método de la reivindicación 1 ó 2, en donde la concentración de la una o más fuentes de carbono es de 200 a 250 g/L.
4. El método de la reivindicación 3, en donde la concentración de la una o más fuentes de carbono es de 200 a 300 g/L.
- 20 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la fuente de carbono se selecciona del grupo que consiste en ácidos grasos, lípidos, glicerolos, triglicéridos, carbohidratos, polioles y aminoazúcares.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la fuente de carbono es glucosa.
- 25 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el pH del medio es de 2 a 4,5.
8. El método de la reivindicación 7, en donde el pH del medio es de 3 a 3,5.
- 30 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende además aislar los ácidos grasos poliinsaturados.
10. El método de la reivindicación 9, en donde el medio no se esteriliza antes del aislamiento de los ácidos grasos poliinsaturados.

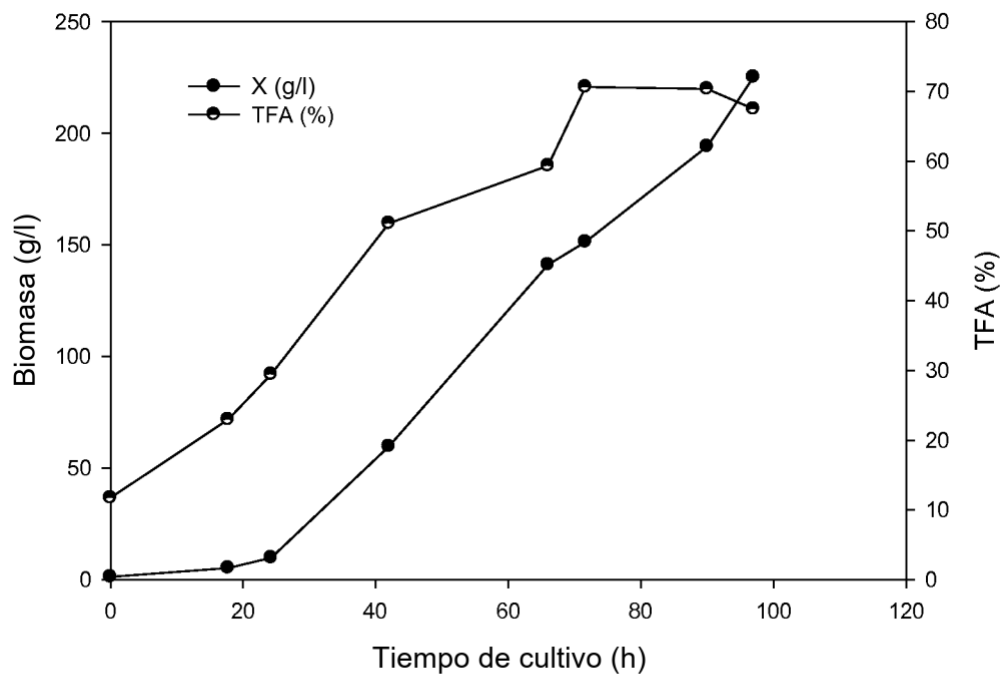


FIG. 1

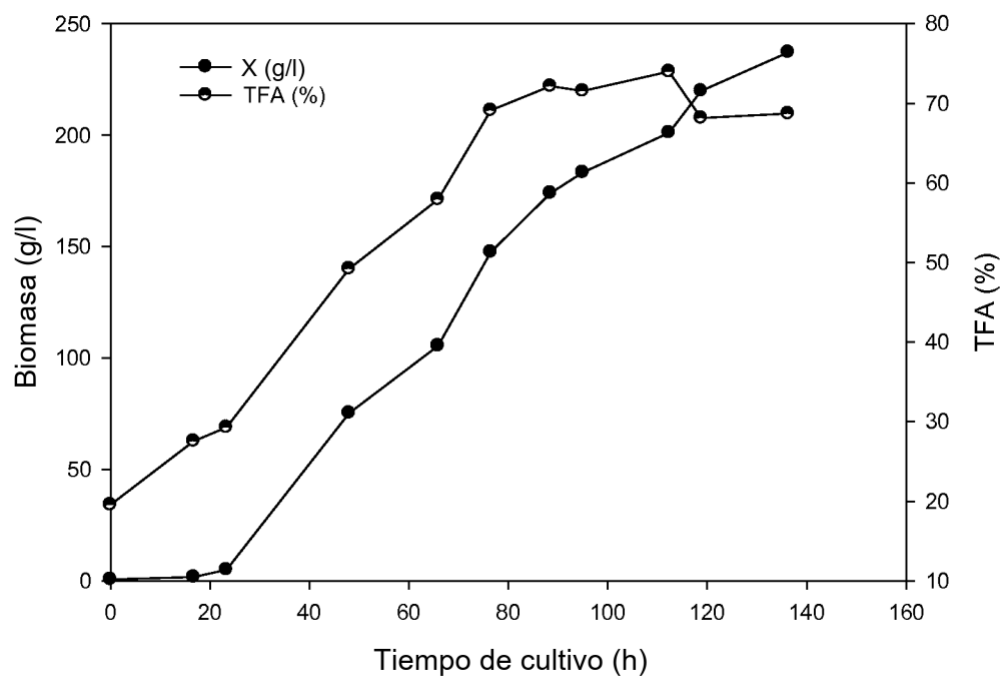


FIG. 2

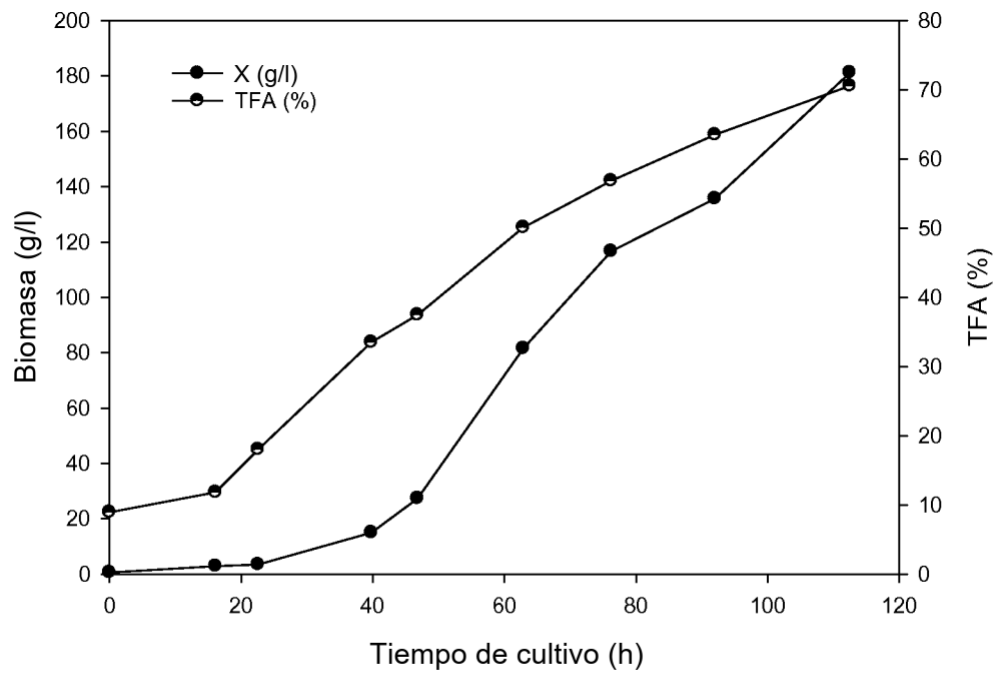


FIG. 3

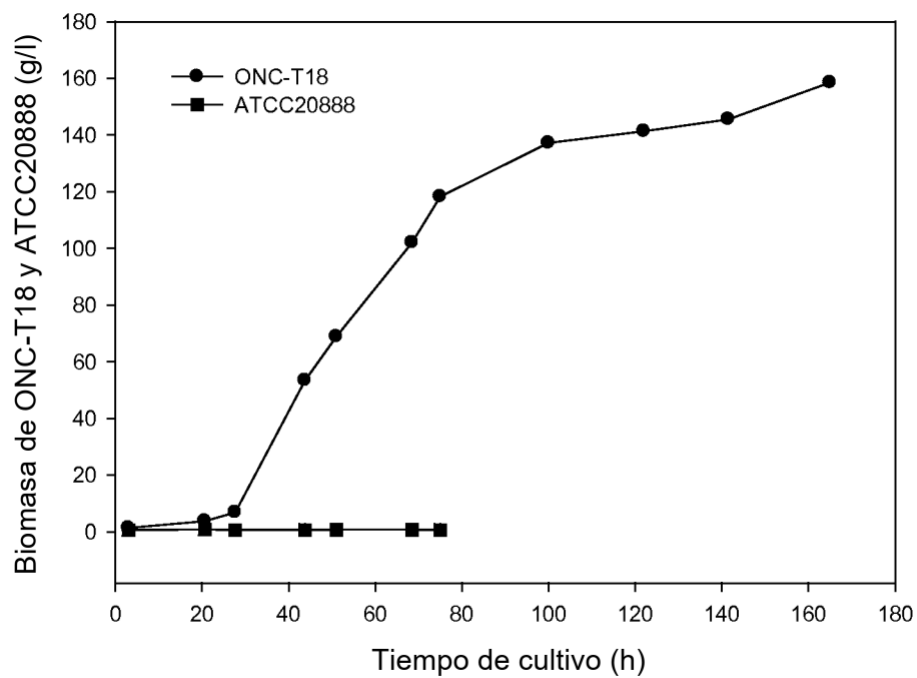


FIG. 4

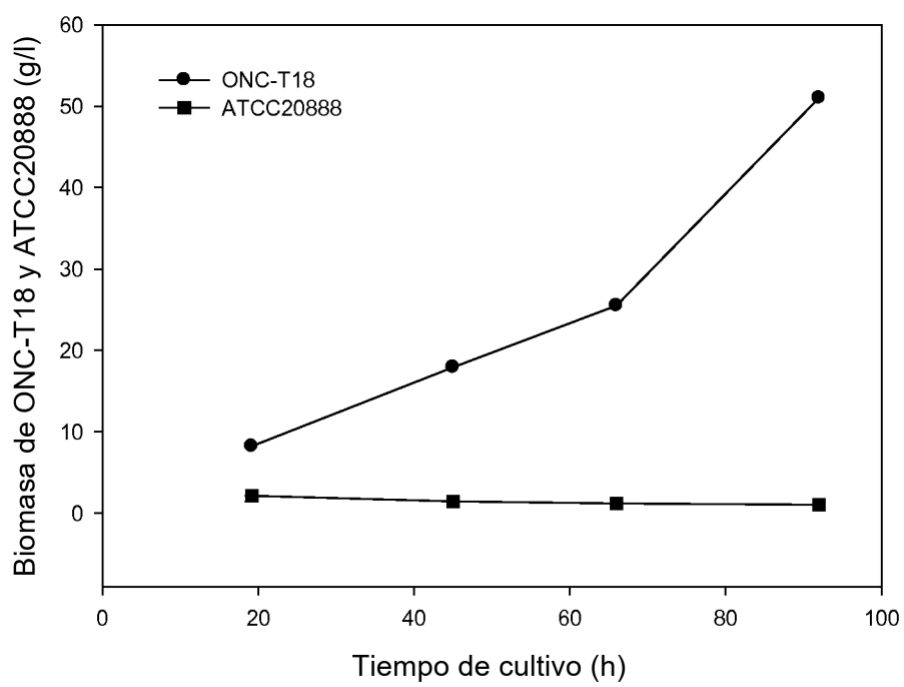


FIG. 5

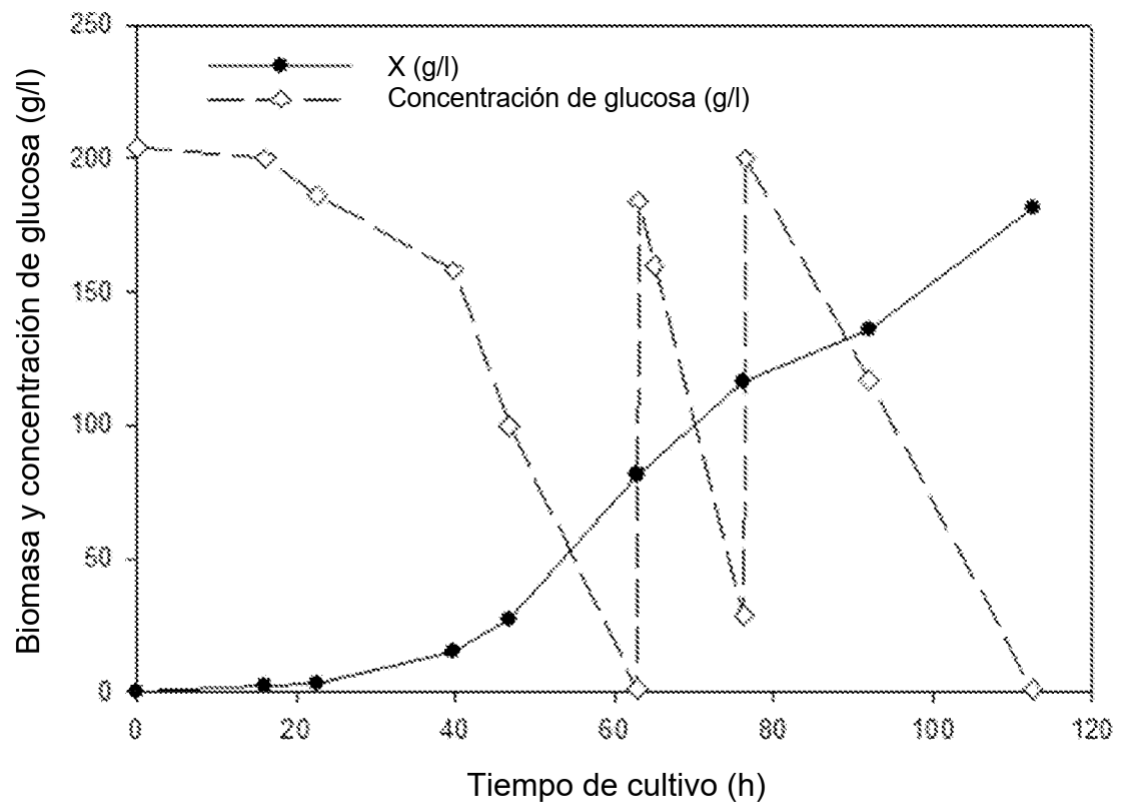


FIG. 6

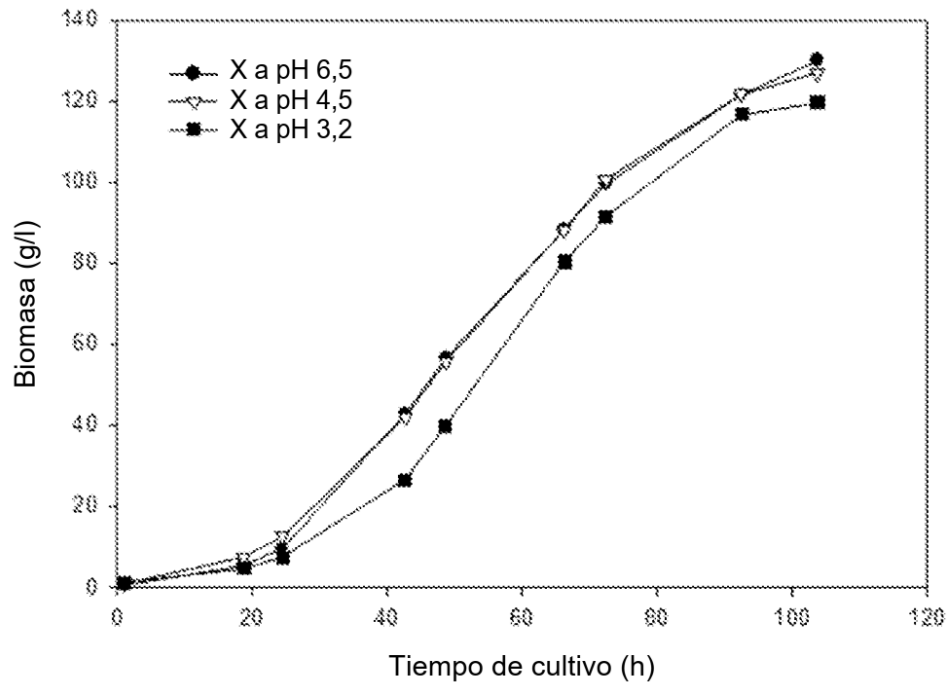


FIG. 7

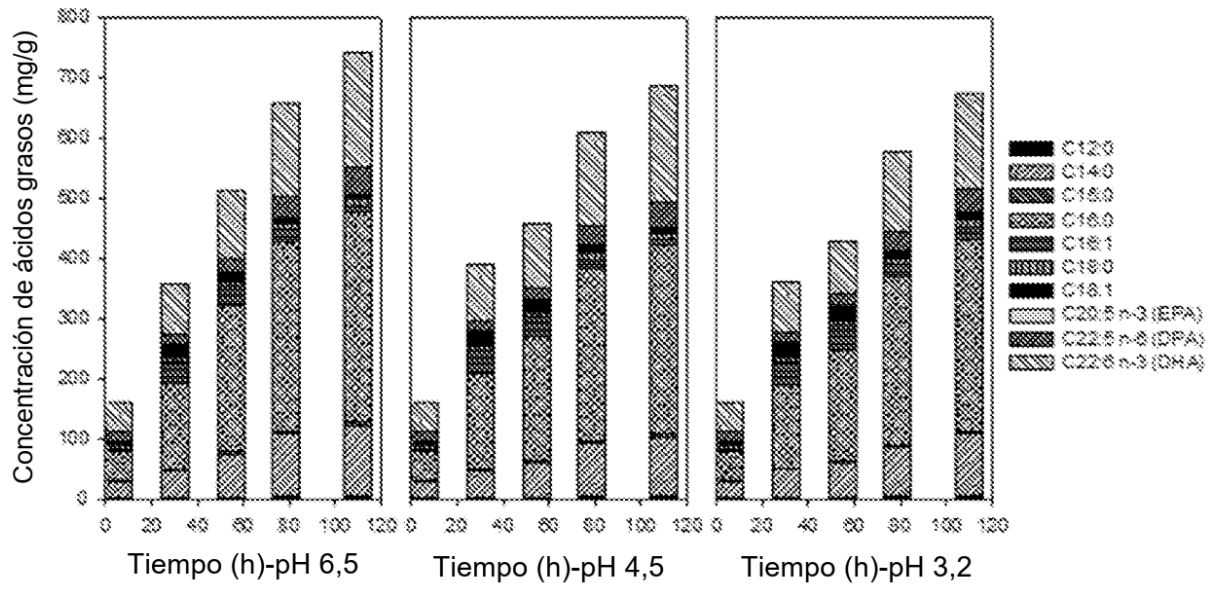


FIG. 8

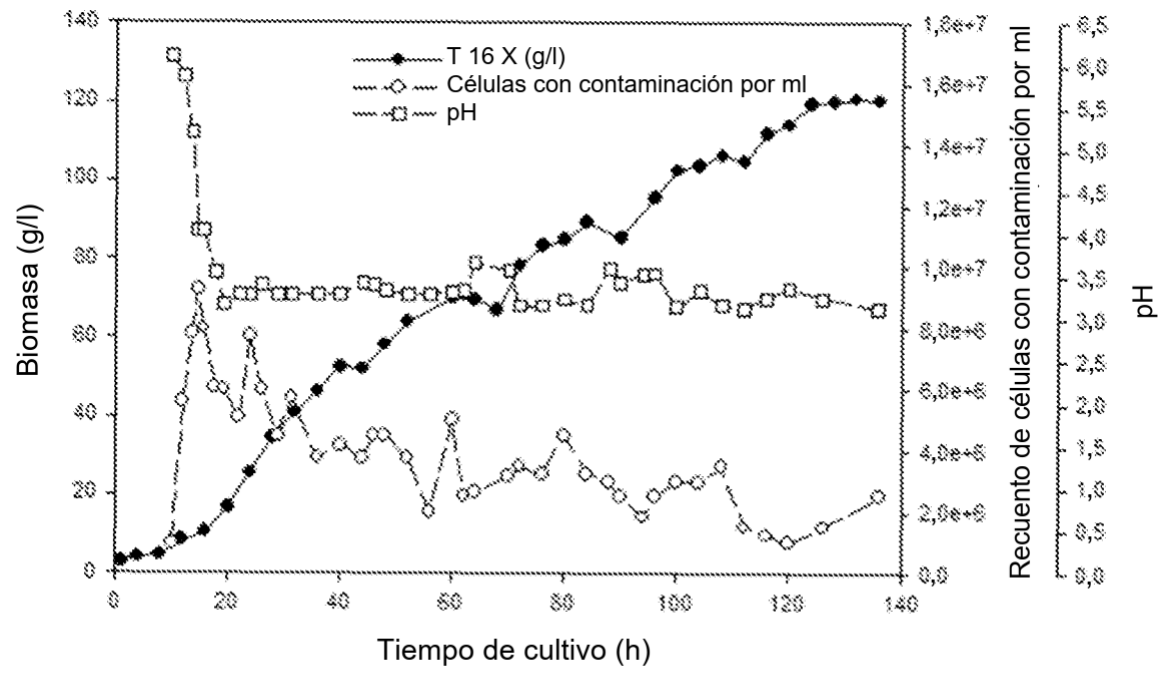


FIG. 9

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- US 2012244584A1 [0003]
- WO 2005045050 A [0003]
- WO 2005021735 A [0003]
- US 5340594 A [0016]
- US 5340742 A [0016] [0023]
- US 8163515 B [0016] [0036]
- US 20090117194 A [0018]
- US 20120244584 A [0018]
- US 6607900 B [0023] [0048]
- WO 62001912 A [0058]

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- **A. BURJA et al.** Isolation and characterization of polyunsaturated fatty acid producing *Thraustochytrium* species: screening of strains and optimization of omega-3 production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, vol. 72 (6), 1161-1169 [0004]