

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 785 331**

51 Int. Cl.:

<b>C12Q 3/00</b>	(2006.01)
<b>C11B 1/00</b>	(2006.01)
<b>C12M 1/36</b>	(2006.01)
<b>C12N 1/00</b>	(2006.01)
<b>C12N 1/10</b>	(2006.01)
<b>C12N 1/14</b>	(2006.01)
<b>C12P 1/00</b>	(2006.01)
<b>C12P 7/64</b>	(2006.01)
<b>C12N 1/04</b>	(2006.01)
<b>C12Q 1/06</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.10.2015 PCT/IB2015/057808**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **21.04.2016 WO16059541**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.10.2015 E 15850374 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.02.2020 EP 3207165**

54 Título: **Métodos de cultivo semicontinuo repetido**

30 Prioridad:

**16.10.2014 US 201462064694 P**

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

**06.10.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BERRYMAN, KEVIN;  
SUN, ZHIYONG;  
MILWAY, MICHAEL;  
VALENTINE, MERCIA y  
ARMENTA, ROBERTO E.**

74 Agente/Representante:

**CONTRERAS PÉREZ, Yahel**

ES 2 785 331 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 cultivo semicontinuo repetido

## 5 Antecedentes de la invención

Las fermentaciones heterotróficas de microorganismos que incluyen especies de *Thraustochytrid* son formas eficientes de generación de productos de aceite y biomasa de alto valor. En ciertas condiciones de cultivo, los microorganismos sintetizan aceite intracelular, que se puede extraer y usar para producir biocombustible (biodiésel, biocombustible para aviones, y similares) y lípidos nutritivos (ácidos grasos poliinsaturados, por ejemplo, DHA, EPA, DPA). La biomasa de microorganismos tales como especies de *Thraustochytrid* también es de gran valor nutritivo debido al alto contenido de PUFA y proteínas y se puede usar como suplemento nutritivo para piensos para animales.

Los procesos de fermentación de microorganismos se llevan a cabo principalmente en procesos discontinuos (en inglés "batch") o semicontinuos (en inglés "fed-batch"). Los procesos discontinuos normalmente implican un cultivo en sistema cerrado en el que las células se cultivan en un volumen fijo de medio de cultivo nutritivo en condiciones específicas (por ejemplo, niveles específicos de nutrientes, temperatura, presión, y similares) hasta una cierta densidad en un fermentador, se recogen y se procesan como un lote. En los procesos semicontinuos típicos, se alimentan uno o más nutrientes o se suministran a un fermentador, en el que permanecen hasta el final del proceso de cultivo. Los procesos de cultivo semicontinuos pueden ser superiores a los procesos de cultivo discontinuos cuando el control de concentraciones de un nutriente (o nutrientes) afecta el rendimiento o la actividad de un producto deseado. Los procesos de fermentación que producen aceite comprenden normalmente dos etapas de cultivo, una etapa de proliferación celular, durante la cual todos los nutrientes necesarios están disponibles para el crecimiento ilimitado del cultivo, seguido por una etapa de acumulación de aceite, durante la cual un nutriente de crecimiento clave (normalmente nitrógeno) se limita intencionadamente en el medio mientras que se proporciona excesivo nutriente de carbono y se canaliza en la síntesis de aceite. Cuando se alcanza la concentración de células diana y el contenido de aceite, se detiene el proceso de fermentación y se recoge la biomasa rica en aceite. Entonces se debe limpiar el recipiente del fermentador, esterilizar y volver a cargar con medio fresco, y se necesita que esté lista una semilla para inocular nuevamente el recipiente de producción (por ejemplo, una operación de "descarga y carga" entre fermentaciones discontinuas/semicontinuas). Dicha operación de descarga y carga consume frecuentemente tiempo y energía y limita las horas de operación disponibles totales del recipiente de producción para un proceso de producción establecido. Alternativamente, se pueden cultivar microorganismos usando métodos continuos donde se añade continuamente medio fresco al fermentador, mientras que se retira continuamente cultivo líquido para mantener el volumen de cultivo constante. Se pueden usar procesos de cultivo continuos para mantener el microorganismo a una velocidad de crecimiento específica o estado estacionario fisiológico, pero puede ser difícil mantenerlos sin alteración y normalmente se usan para fines de investigación, ya que los cultivos semicontinuos o discontinuos tienden a proporcionar mejores resultados (por ejemplo, mayor rendimiento de aceite) y son más fáciles de usar para fines de producción a gran escala.

X.-J.Ji et al. en "Efficient arachidonic acid-rich oil production by *Mortierella alpina* through a repeated fed-batch fermentation strategy", *Bioresource Technology* 170 (2014), páginas 356 - 360, desvelan la producción de ácido araquidónico (ARA) en *Mortierella alpina*.

Zhao et al. en "Lipid production by *Rhodospiridium toruloides* Y4 using different substrate feeding strategies", *J Ind Microbiol Biotechnol* (2011)38:627-632, desvelan el uso de levadura para producir aceite.

El documento de patente WO 2010/097809 A2 desvela un proceso semicontinuo para la producción fermentativa de ácido docosahexaenoico, en el que se retiran células en un punto cuando las células que quedan en el fermentador se están dividiendo activamente o están en la fase logarítmica de crecimiento.

Hekmat et al. en, "Optimization of the microbial synthesis of dihydroxyacetone from glycerol with *Gluconobacter oxydans*", *Bioprocess Biosyst Eng* (2003) 26:109-116, y en "Optimization of the microbial synthesis of dihydroxyacetone in a semi-continuous repeated-fed-batch process by in situ immobilization of *Gluconobacter oxydans*", *Process Biochemistry* 42 (2007) 71-76 desvelan producir dihidroxiacetona a partir de *Gluconobacter oxydans*.

El documento de patente WO 2011/011660 A2 desvela un método de producción de virus u otros productos de proteína usando células de mamífero en un biorreactor microportador.

## 60 Breve resumen de la invención

En el presente documento se proporcionan métodos como se definen en las reivindicaciones de cultivo de un microorganismo. Los métodos incluyen proporcionar un recipiente que comprende uno o más microorganismos y medio, en donde los microorganismos y el medio forman un volumen de partida, cultivar los microorganismos en el

medio hasta que el cultivo alcance un indicador umbral, en donde cultivar comprende alimentar una o más fuentes de carbono al cultivo y en donde el cultivo está en un volumen umbral cuando se alcanza el indicador umbral, recoger una porción del volumen umbral para dejar un volumen residual que es 40 % o menos del volumen de partida, y añadir medio fresco al recipiente en una cantidad para devolver el volumen del cultivo al volumen de partida.

5

### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico que muestra la progresión de la concentración de biomasa y la concentración de aceite en el recipiente con el tiempo durante una fermentación semicontinua repetida en un fermentador de 30 L.

10

La Figura 2 es un gráfico que muestra la mejora de la productividad de biomasa y de la productividad de aceite durante toda una fermentación semicontinua repetida en fermentador de 30 L, así como la productividad de biomasa y productividad de aceite constante de fermentaciones semicontinuas. RFB en la leyenda representa semicontinua repetida.

15

La Figura 3 es un gráfico que muestra la progresión de la concentración de biomasa y la concentración de aceite en el recipiente con el tiempo durante una fermentación semicontinua repetida en un fermentador de 7 L.

La Figura 4 es un gráfico que muestra la mejora de la productividad de biomasa y de la productividad de aceite durante toda una fermentación semicontinua repetida en un fermentador de 7 L, así como la productividad de biomasa y la productividad de aceite constante de fermentaciones semicontinuas. RFB en la leyenda representa semicontinua repetida.

20

La Figura 5 es un gráfico que muestra el impacto de cambiar el volumen de semilla residual (20 %, 30 % y 40 %) sobre la biomasa promedio global y las productividades de aceite. RFB en el eje representa semicontinua repetida.

### Descripción detallada de la invención

25

Se proporcionan métodos de cultivo de microorganismos y métodos de producción aceite por un proceso semicontinuo repetido en el presente documento. Los métodos proporcionados dan como resultado mayor productividad volumétrica global de tanto biomasa como aceite que un proceso discontinuo o semicontinuo típico. Brevemente, el proceso implica cultivar microorganismos en un método semicontinuo donde, tras completarse la fermentación como se define alcanzándose un volumen particular y/o cumpliendo los rendimientos volumétricos de biomasa y aceite, el recipiente se drena de un modo que mantiene su esterilidad y deja atrás un cierto volumen de cultivo predeterminado (por ejemplo, 20 % del volumen medio inicial). Entonces se añade medio estéril nuevo al recipiente donde se usa el cultivo dejado atrás de la fermentación previa como una semilla. Este proceso se puede repetir indefinidamente. La cantidad de cultivo dejada atrás para su uso como una semilla puede variar; sin embargo, se debe considerar el intercambio entre biomasa dejada sin recoger, y el tiempo reducido pasado en la fase de latencia de la fermentación posterior. En el uso de un proceso semicontinuo repetido, se reduce significativamente el tiempo de descarga y carga del fermentador que, a su vez, conduce a mayor productividad volumétrica global de biomasa y aceite; superando con creces la de procesos discontinuos y semicontinuos convencionales. Por tanto, el proceso semicontinuo repetido minimiza la necesidad de limpieza y esterilización, reduciendo así los costes de operación. Además, existe menos dependencia de un cultivo de semillas, que reduce tanto los costes de trabajo como de energía.

40

### Microorganismos

Los métodos descritos en el presente documento incluyen extraer lípidos de una población de microorganismos. El microorganismo es un *Thraustochytrid* productor de aceite del orden *Thraustochytriales*, y, más específicamente, *Thraustochytriales* del género *Thraustochytrium*. Opcionalmente, la población de microorganismos incluye *Thraustochytriales* como se describe en las patentes de EE.UU. N° 5.340.594 y 5.340.742. El microorganismo puede ser una especie de *Thraustochytrium*, tal como las especies de *Thraustochytrium* depositadas con el N° de acceso de ATCC PTA-6245 (es decir, ONC-T18) como se describe en la patente de EE.UU. N° 8.163.515. Así, el microorganismo puede tener una secuencia de ARNr 18s que es al menos 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 (por ejemplo, que incluye 100 %) idéntica a SEQ ID NO:1.

50

Los microorganismos para su uso en los métodos descritos en el presente documento pueden producir una variedad de compuestos lipídicos. Como se usa en el presente documento, el término lípido incluye fosfolípidos, ácidos grasos libres, ésteres de ácidos grasos, triacilgliceroles, esteroides y ésteres de esteroles, carotenoides, xantófilos (por ejemplo, oxicarotenoides), hidrocarburos, y otros lípidos conocidos por un experto habitual en la técnica. Opcionalmente, los compuestos lipídicos incluyen lípidos insaturados. Los lípidos insaturados pueden incluir lípidos poliinsaturados (es decir, lípidos que contienen al menos 2 enlaces carbono-carbono insaturados, por ejemplo, dobles enlaces) 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/o omega-6, tales como ácido docosahexaenoico (es decir, DHA), ácido eicosapentaenoico (es decir, EPA), y otros compuestos insaturados, poliinsaturados y altamente insaturados que existen de forma natural.

60

### Procesos

En el presente documento se proporciona un método de cultivo de un microorganismo *Thraustochytrid* productor de aceite. El método incluye

- 5 (a) proporcionar un recipiente que comprende uno o más microorganismos *Thraustochytrid* productores de aceite y medio, en donde los microorganismos y el medio forman un volumen de partida;
- (b) cultivar los microorganismos *Thraustochytrid* productores de aceite en el medio en el recipiente:
  - 10 (i) cultivar los microorganismos *Thraustochytrid* productores de aceite en condiciones que favorecen la producción de biomasa; y
  - (ii) cultivar los microorganismos *Thraustochytrid* productores de aceite de la etapa (i) en condiciones que favorecen la producción de lípidos hasta que el cultivo complete la fermentación y alcance un volumen umbral cuando se completa la fermentación,
- 15 en donde el cultivo comprende alimentar una o más fuentes de carbono al cultivo;
  - (c) recoger una porción del volumen umbral para dejar un volumen residual en el recipiente que es 20 % a 40 % del volumen de partida; y
  - (d) añadir medio fresco al recipiente en una cantidad para devolver el volumen del cultivo al volumen de partida; y
  - 20 (e) repetir las etapas (b), (c) y (d).

Los métodos son aplicables a la fermentación a gran escala, así como a la fermentación a pequeña escala, y a cualquier escala de fermentación intermedia. Fermentación a gran escala, como se usa en el presente documento, se refiere a fermentación en un fermentador que tiene al menos aproximadamente 1.000 L de capacidad volumétrica (es decir, volumen de trabajo), quedando espacio adecuado para el espacio de cabeza. Fermentación a pequeña escala se refiere, en general, a fermentación en un fermentador que tiene, en general, no más de aproximadamente 100 L de capacidad volumétrica, tal como 5 L, 10 L, 50 L o 100 L. Una ventaja demostrada del presente proceso de fermentación semicontinua es que se puede utilizar para la producción de aceite en el fermentador de 5-10 L de escala y es escalable a cualquier volumen, por ejemplo, 100 L, 150 L, 250 L, 500 L, 1000 L o más, sin limitación.

30 Como se describe en más detalle en los ejemplos a continuación, el proceso semicontinuo repetido alivia, si no elimina, el tiempo de descarga y carga del recipiente de producción, con el objetivo definitivo de aumentar la productividad volumétrica. Un ejemplo de cómo aumenta la productividad volumétrica con respecto a la típica fermentación semicontinua se ilustra en la Figura 1. Suponiendo un tiempo de descarga y carga de 24 horas para que el recipiente de producción se incluya en el tiempo de proceso total, la productividad global de biomasa (X) en cualquier momento dado se puede calcular como:  $X \text{ (gramos)/Volumen de trabajo del recipiente (L)/Tiempo} * 24 \text{ (horas/día)}$ , siendo la unidad final g/L-día. La productividad de aceite se puede calcular de una manera similar como:  $\text{Aceite (g)/Volumen de trabajo del recipiente (L)/Tiempo} * 24 \text{ (horas/día)}$ . Como se observa en la Figura 2, las productividades de biomasa y aceite de un proceso semicontinuo permanecerán constantes con el tiempo. En cambio, después del primer ciclo del proceso semicontinuo repetido, aumenta la productividad promedio, superando con creces la del proceso semicontinuo ya que no se requiere el tiempo de descarga y carga, y disminuye el tiempo de ciclo debido a la elevada densidad de semillas, en este conjunto de datos se empleó un 20 % de semilla.

En los métodos proporcionados, el volumen residual puede ser desde 20 % a 40 % del volumen de partida.

45 Los métodos proporcionados incluyen cultivar los microorganismos hasta que el cultivo alcance un indicador umbral para un parámetro. Como se usa en el presente documento, el término parámetro se refiere a una variable en las condiciones de cultivo que se pueden monitorizar y controlar para ajustar el progreso de un cultivo de microorganismos. Un indicador umbral es un nivel preseleccionado o concentración para un parámetro dado. Dichos parámetros incluyen, pero no se limitan a, volumen de cultivo, densidad óptica (DO), concentración de células, velocidad de producción de dióxido de carbono, pH, oxígeno disuelto (OD), tiempo, concentración de nutriente en medio de cultivo, acumulación de subproductos metabólicos, temperatura, productividad de biomasa y productividad de aceite. Se contempla el uso de cualquier parámetro adecuado o combinación de parámetros como sería entendido por un experto habitual en la técnica y basándose en la orientación proporcionada en el presente documento. Opcionalmente, el indicador umbral es un nivel preseleccionado o concentración de nutriente(s) en el medio de cultivo. Los nutrientes adecuados que se pueden medir en el medio de cultivo incluyen, pero no se limitan a, carbono y nitrógeno.

60 Los métodos proporcionados incluyen repetir las etapas de (i) cultivar los microorganismos *Thraustochytrid* productores de aceite en el medio en condiciones que favorecen la producción de biomasa y cultivar adicionalmente los microorganismos *Thraustochytrid* productores de aceite en condiciones que favorecen la producción de lípidos hasta que el cultivo alcance un volumen umbral cuando se complete la fermentación, en donde el cultivo comprende alimentar una o más fuentes de carbono al cultivo; (ii) recoger una porción del volumen umbral para dejar un volumen residual que es 20 % a 40 % del volumen de partida; y (iii) añadir medio fresco al recipiente en una cantidad para devolver el volumen del cultivo al volumen de partida. Opcionalmente, las etapas se repiten dos o más veces.

Opcionalmente, las etapas se repiten 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces. Cuando el proceso se repite múltiples veces, como se trata anteriormente, el volumen de partida y los volúmenes residuales pueden variar cada vez o cada ronda. Opcionalmente, los volúmenes de partida y los volúmenes residuales pueden permanecer igual cada vez o cada ronda. También puede variar el volumen residual en las sucesivas rondas. Los métodos proporcionados permiten

5 ventajosamente mantener el cultivo durante un largo periodo de tiempo. Como tal, se pueden repetir las etapas del método, en tanto que se desea mantener el cultivo y continuar recogiendo una porción para uso adicional. Opcionalmente, el cultivo se mantiene durante un periodo de horas, días, semanas o meses. Opcionalmente, el cultivo se mantiene durante al menos 150 a 500 horas. Por ejemplo, el cultivo se puede mantener durante al menos 250 horas. Opcionalmente, el cultivo se mantiene durante una, dos, tres, cuatro, o cinco semanas.

10

Opcionalmente, los métodos proporcionados incluyen la producción de una semilla individual o solo una semilla o cultivo de semillas. El cultivo semicontinuo típico de microorganismos requiere la producción de un cultivo de semillas producido en un modo escalonado denominado un cultivo de semillas. El cultivo de semillas sirve para reforzar el volumen y la densidad de un cultivo para inocular un recipiente de producción limpio y estéril. Un cultivo de semillas

15 requiere tiempo, energía para la esterilización, y también crea más oportunidad de contaminación ya que el cultivo se transfiere entre múltiples recipientes. El método semicontinuo repetido requiere que este cultivo de semillas solo inocule el primer ciclo. Asimismo, solo se necesita esterilizar el recipiente de producción para el ciclo inicial. Por tanto, se ahorra tiempo en girar el recipiente de producción (limpieza y esterilización) y se ahorra energía de la limpieza, esterilización y operación de recipientes en el cultivo de semillas. Así, los métodos proporcionados incluyen

20 opcionalmente una etapa de esterilización individual. Además, se alivia el riesgo de contaminación de las transferencias de cultivo en el cultivo de semillas para lotes secuenciales. Así, los métodos proporcionados dan como resultado una contaminación reducida en comparación con procesos discontinuos o continuos típicos.

Usando el cultivo del recipiente de producción (es decir, el volumen residual) como la semilla para lotes sucesivos

25 también permite la elección de seleccionar el porcentaje de semilla a usar sin requerir la compra de equipo más grande o fermentador adicional en el cultivo de semillas. Por ejemplo, se podría usar un 2 % de volumen de semillas (2000 L para un volumen de partida de 100.000 L en un recipiente de producción de 200.000 L de volumen de trabajo) para la fermentación discontinua inicial, mientras que todas las siguientes iteraciones se podrían inocular con un 10 % de semilla. Un 2 % de cultivo de semilla elimina la necesidad de un recipiente mayor en el cultivo de semillas (es decir,

30 un recipiente de 10.000 L de volumen de trabajo) aliviando los gastos de capital/inversión y reduciendo el riesgo de contaminación ya que existe una transferencia menos de cultivo de semillas. Usando un 2 % de semilla, aumenta la fase de latencia del crecimiento de microorganismos, que conduce a menores productividades volumétricas en los recipientes de producción. Sin embargo, con lotes sucesivos que usan el método semicontinuo repetido que se inocula con un 10 % de volumen de semillas, se acorta espectacularmente esta fase de latencia larga.

35

Los métodos proporcionados incluyen o se pueden usar junto con etapas adicionales para cultivar microorganismos según métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede cultivar un *Thraustochytrid*, por ejemplo, un *Thraustochytrium sp.*, según los métodos descritos en las publicaciones de patente de EE.UU. 2009/0117194 o 2012/0244584.

40

Los microorganismos se cultivan en un medio de crecimiento (también conocido como "medio de cultivo"). Puede ser adecuado cualquiera de una variedad de medios para su uso en cultivar los microorganismos descritos en el presente documento. Opcionalmente, el medio suministra diversos componentes nutricionales, que incluyen una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno, para el microorganismo. El medio para el cultivo de *Thraustochytrid* puede incluir

45 cualquiera de una variedad de fuentes de carbono. Los ejemplos de fuentes de carbono incluyen ácidos grasos, lípidos, gliceroles, trigliceroles, hidratos de carbono, polioles, aminoazúcares, y cualquier tipo de biomasa o corriente residual. Los ácidos grasos incluyen, por ejemplo, ácido oleico. Los hidratos de carbono incluyen, pero no se limitan a, glucosa, celulosa, hemicelulosa, fructosa, dextrosa, xilosa, lactulosa, galactosa, maltotriosa, maltosa, lactosa, glucógeno, gelatina, almidón (maíz o trigo), acetato, m-inositol (por ejemplo, derivado de extracto soluble de maíz), ácido galacturónico (por ejemplo, derivado de pectina), L-fucosa (por ejemplo, derivado de galactosa), gentiobiosa,

50 glucosamina, alfa-D-glucosa-1-fosfato (por ejemplo, derivado de glucosa), celobiosa, dextrina, alfa-ciclodextrina (por ejemplo, derivado de almidón) y sacarosa (por ejemplo, de melaza). Los polioles incluyen, pero no se limitan a, maltitol, eritritol y adonitol. Los aminoazúcares incluyen, pero no se limitan a, N-acetil-D-galactosamina, N-acetil-D-glucosamina y N-acetil-beta-D-manosamina. Opcionalmente, la fuente de carbono es glucosa. Como se observa anteriormente, en

55 los métodos proporcionados, la fuente de carbono se proporciona a una alta concentración, por ejemplo, al menos 200 g/L.

Opcionalmente, los microorganismos proporcionados en el presente documento se cultivan en condiciones que aumentan la biomasa y/o producción de un compuesto de interés (por ejemplo, contenido de aceite o ácido graso total

60 (TFA)). Los *Thraustochytrid*, por ejemplo, se cultivan normalmente en medio de solución salina. Opcionalmente, los *Thraustochytrid* se pueden cultivar en medio que tiene una concentración de sales desde aproximadamente 0,5 g/L hasta aproximadamente 50,0 g/L. Opcionalmente, los *Thraustochytrid* se cultivan en medio que tiene una concentración de sales desde aproximadamente 0,5 g/L hasta aproximadamente 35 g/L (por ejemplo, desde aproximadamente 18 g/L hasta aproximadamente 35 g/L). Opcionalmente, los *Thraustochytrid* descritos en el presente

documento se pueden cultivar en condiciones de baja sal. Por ejemplo, los *Thraustochytrid* se pueden cultivar en un medio que tiene una concentración de sales desde aproximadamente 0,5 g/L hasta aproximadamente 20 g/L (por ejemplo, desde aproximadamente 0,5 g/L hasta aproximadamente 15 g/L). El medio de cultivo incluye opcionalmente NaCl. Opcionalmente, el medio incluye agua de mar natural o artificial y/o agua marina artificial.

5

El medio de cultivo puede incluir sales de sodio que no contienen cloruro como fuente de sodio. Los ejemplos de sales de sodio no de cloruro adecuadas para su uso según los presentes métodos incluyen, pero no se limitan a, ceniza de soda (una mezcla de carbonato sódico y óxido sódico), carbonato sódico, bicarbonato sódico, sulfato de sodio, y mezclas de los mismos. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 5.340.742 y 6.607.900. Una porción significativa del sodio total, por ejemplo, se puede suministrar por sales no de cloruro de forma que menos de aproximadamente 100 %, 75 %, 50 %, o 25 % del sodio total en el medio de cultivo se suministre por cloruro sódico.

10

Opcionalmente, el medio de cultivo tiene concentraciones de cloruro inferiores a 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 entre y que incluyen aproximadamente 60 mg/L y 120 mg/L.

15

El medio para el cultivo de *Thraustochytrid* puede incluir cualquiera de una variedad de fuentes de nitrógeno. Las fuentes de nitrógeno a modo de ejemplo incluyen disoluciones de amonio (por ejemplo,  $\text{NH}_4$  en  $\text{H}_2\text{O}$ ), sales de amonio o amina (por ejemplo,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{OOCH}_2\text{CH}_3$  ( $\text{NH}_4\text{Ac}$ )), peptona, triptona, extracto de levadura, extracto de malta, harina de pescado, glutamato sódico, extracto de soja, casaminoácidos y granos de destilación. Las concentraciones de fuentes de nitrógeno en medio adecuado normalmente varían entre e incluyen aproximadamente 1 g/L y aproximadamente 25 g/L.

20

El medio incluye opcionalmente un fosfato, tal como fosfato de potasio o fosfato de sodio. Las sales inorgánicas y oligonutrientes en el medio pueden incluir sulfato de amonio, bicarbonato sódico, ortovanadato de sodio, cromato de potasio, molibdato de sodio, ácido selenoso, sulfato de níquel, sulfato de cobre, sulfato de cinc, cloruro de cobalto, cloruro de hierro, cloruro de manganeso, cloruro de calcio y EDTA. Se pueden incluir vitaminas tales como clorhidrato de piridoxina, clorhidrato de tiamina, pantotenato de calcio, ácido p-aminobenzoico, riboflavina, ácido nicotínico, biotina, ácido fólico y vitamina B12.

30

El pH del medio se puede ajustar a entre y que incluye 3,0 y 10,0 usando ácido o base, cuando corresponda, y/o usando la fuente de nitrógeno. Opcionalmente, el medio se puede esterilizar.

En general, un medio usado para el cultivo de un microorganismo es un medio líquido. Sin embargo, el medio usado para el cultivo de un microorganismo puede ser un medio sólido. Además de fuentes de carbono y de nitrógeno como se trata 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.

35

Se pueden cultivar células durante un periodo de tiempo. Opcionalmente, las células se cultivan durante cualquiera desde 1 día hasta 60 días. Opcionalmente, el cultivo se mantiene durante un periodo de horas, días, semanas o meses. Opcionalmente, el cultivo se mantiene durante al menos 150 a 500 horas. Opcionalmente, el cultivo se mantiene durante al menos 250 horas. Opcionalmente, el cultivo se mantiene durante una, dos, tres, cuatro o cinco semanas. El cultivo se lleva a cabo opcionalmente a temperaturas desde aproximadamente 4 °C hasta aproximadamente 30 °C, por ejemplo, desde aproximadamente 18 °C hasta aproximadamente 28 °C. El cultivo puede incluir cultivo con aireación-agitación, cultivo con agitación, cultivo estacionario, cultivo discontinuo, cultivo semicontinuo, cultivo continuo, cultivo de lotes rodantes, cultivo de onda, o similares. El cultivo se puede realizar usando un fermentador de agitación convencional, un fermentador de columna de burbujeo (cultivos discontinuos o continuos), un fermentador con elevación de aire, un fermentador de onda, y similares.

45

Los cultivos se pueden airear por uno o más de una variedad de métodos, que incluyen agitación. Opcionalmente, la agitación varía desde aproximadamente 100 rpm hasta aproximadamente 1000 rpm, por ejemplo, desde aproximadamente 350 rpm hasta aproximadamente 600 rpm, o desde aproximadamente 100 hasta aproximadamente 450 rpm. Opcionalmente, los cultivos se airean usando diferentes velocidades de agitación durante las fases productoras de biomasa y durante las fases productoras de lípido. Alternativamente o además, se pueden variar las velocidades de agitación dependiendo del tipo de recipiente de cultivo (por ejemplo, forma o tamaño del matraz).

50

La producción de lípidos deseables se puede potenciar cultivando células según métodos que implican un desplazamiento de una o más condiciones de cultivo para obtener mayores cantidades de compuestos deseables. Las células se cultivan primero en condiciones que maximizan la biomasa, seguido por un desplazamiento de una o más condiciones de cultivo a condiciones que favorecen la productividad de lípidos. Las condiciones que son desplazadas pueden incluir concentración de oxígeno, relación C:N, temperatura, y combinaciones de las mismas. Se realiza el cultivo de dos etapas en el que una primera etapa favorece la producción de biomasa (por ejemplo, usando condiciones de alto oxígeno (por ejemplo, en general, o con respecto a la segunda etapa), baja relación C:N y temperatura ambiente), seguido por una segunda etapa que favorece la producción de lípidos (por ejemplo, en la que

60

disminuye el oxígeno, aumenta la relación C:N, y disminuye la temperatura, en comparación con la primera etapa). A diferencia de los métodos previamente descritos, los métodos proporcionados permiten mantener el cultivo durante un tiempo prolongado en condiciones a altos niveles de producción de aceite o lípidos.

#### 5 *Pasteurización*

Opcionalmente, la biomasa resultante se pasteuriza para inactivar sustancias no deseables presentes en la biomasa. Por ejemplo, la biomasa se puede pasteurizar para inactivar sustancias que degradan 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 medio de fermentación hasta una temperatura elevada. Por ejemplo, la biomasa y/o el medio de fermentación se pueden calentar hasta una temperatura desde aproximadamente 50 °C hasta aproximadamente 95 °C (por ejemplo, desde aproximadamente 55 °C hasta aproximadamente 90 °C, o desde aproximadamente 65 °C hasta aproximadamente 80 °C). Opcionalmente, la biomasa y/o el medio de fermentación se pueden calentar desde aproximadamente 30 minutos hasta aproximadamente 120 minutos (por ejemplo, desde aproximadamente 45 minutos hasta aproximadamente 90 minutos, o desde aproximadamente 55 minutos hasta aproximadamente 75 minutos). La pasteurización se puede realizar usando un medio de calentamiento adecuado, tal como, por ejemplo, por inyección directa de vapor de agua.

Opcionalmente, no se realiza etapa de pasteurización. Dicho de otra forma, el método enseñado en el presente documento carece opcionalmente de una etapa de pasteurización.

#### *Recogida y lavado*

La biomasa se puede recoger según una variedad de métodos, que incluyen los actualmente conocidos para un experto en la técnica. Por ejemplo, la biomasa se puede recoger del medio de fermentación usando, por ejemplo, centrifugación (por ejemplo, con una centrifugadora de expulsión de sólido) o filtración (por ejemplo, filtración de flujo cruzado). Opcionalmente, la etapa de recogida incluye el uso de un agente de precipitación para la recogida acelerada de biomasa celular (por ejemplo, fosfato de sodio o cloruro de calcio).

Opcionalmente, la biomasa se lava con agua. Opcionalmente, la biomasa se puede concentrar hasta aproximadamente 20 % de sólidos. Por ejemplo, la biomasa se puede concentrar hasta aproximadamente 5 % hasta aproximadamente 20 % de sólidos, desde aproximadamente 7,5 % hasta aproximadamente 15 % sólidos, o desde aproximadamente sólidos hasta aproximadamente 20 % de sólidos, o cualquier porcentaje dentro de los intervalos citados. Opcionalmente, la biomasa se puede concentrar a aproximadamente 20 % de sólidos o menos, aproximadamente 19 % sólidos o menos, aproximadamente 18 % sólidos o menos, aproximadamente 17 % sólidos o menos, aproximadamente 16 % sólidos o menos, aproximadamente 15 % sólidos o menos, aproximadamente 14 % sólidos o menos, aproximadamente 13 % sólidos o menos, aproximadamente 12 % sólidos o menos, aproximadamente 11 % sólidos o menos, aproximadamente 10 % sólidos o menos, aproximadamente 9 % sólidos o menos, aproximadamente 8 % sólidos o menos, aproximadamente 7 % sólidos o menos, aproximadamente 6 % sólidos o menos, aproximadamente 5 % sólidos o menos, aproximadamente 4 % sólidos o menos, aproximadamente 3 % sólidos o menos, aproximadamente 2 % sólidos o menos, o aproximadamente 1 % sólidos o menos.

#### *Aislamiento y extracción*

Los métodos proporcionados, opcionalmente, incluyen aislar los ácidos grasos poliinsaturados de la biomasa o microorganismos. El aislamiento de los ácidos grasos poliinsaturados se puede realizar usando uno o más de una variedad de métodos, que incluyen los actualmente conocidos por un experto en la técnica. Por ejemplo, se describen métodos de aislamiento de ácidos grasos poliinsaturados en la patente de EE.UU. Nº 8.163.515.

Opcionalmente, el medio no se esteriliza antes del aislamiento de los ácidos grasos poliinsaturados. Opcionalmente, la esterilización comprende un aumento en la temperatura. Opcionalmente, los ácidos grasos poliinsaturados producidos por los microorganismos y aislados 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 docosahexaenoico, ácido docosapentaenoico, ácido eicosapentaenoico, ácido gamma-linolénico, ácido linoleico, ácido linolénico, y combinaciones de los mismos.

#### **Productos**

El aceite que incluye ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) y otros lípidos producidos según el método descrito en el presente documento se puede utilizar en cualquiera de una variedad de aplicaciones que explotan sus propiedades biológicas, nutricionales, o químicas. Así, los métodos proporcionados opcionalmente incluyen aislar aceite de la porción recogida del volumen umbral. Opcionalmente, el aceite se usa para producir combustible, por ejemplo, biocombustible. Opcionalmente, el aceite se puede usar en productos farmacéuticos, suplementos alimenticios, aditivos para piensos animales, cosméticos, y similares. Los lípidos producidos según los métodos descritos en el

presente documento también se pueden usar como productos intermedios en la producción de otros compuestos.

A modo de ejemplo, el aceite producido por los microorganismos cultivados usando los métodos proporcionados puede comprender ácidos grasos. Opcionalmente, los ácidos grasos se seleccionan del grupo que consiste en ácido alfa-linolénico, ácido araquidónico, ácido docosahexaenoico, ácido docosapentaenoico, ácido eicosapentaenoico, ácido gamma-linolénico, ácido linoleico, ácido linolénico, y combinaciones de los mismos. Opcionalmente, el aceite comprende triglicéridos. Opcionalmente, el aceite comprende ácidos grasos seleccionados del grupo que consiste en ácido palmítico (C16:0), ácido mirístico (C14:0), ácido palmitoleico (C16:1(n-7)), ácido cis-vaccénico (C18:1(n-7)), ácido docosapentaenoico (C22:5(n-6)), ácido docosahexaenoico (C22:6(n-3)), y combinaciones de los mismos.

Opcionalmente, los lípidos producidos según los métodos descritos en el presente documento se pueden incorporar en un producto final (por ejemplo, un suplemento alimenticio o para piensos, una leche maternizada, un producto farmacéutico, un combustible, etc.). Los suplementos alimenticios o para piensos adecuados en los que los lípidos se pueden incorporar incluyen bebidas tales como leche, agua, bebidas isotónicas, bebidas energéticas, tés y zumos; golosinas tales como caramelos, mermeladas, y galletas; alimentos y bebidas que contienen grasas tales como productos lácteos; productos alimenticios procesados tales como arroz meloso (o gachas); leches maternizadas; cereales para el desayuno; o similares. Opcionalmente, se pueden incorporar uno o más lípidos producidos en un suplemento dietético, tales como, por ejemplo, una vitamina o multivitamina. Opcionalmente, un lípido producido según el método descrito en el presente documento se puede incluir en un suplemento dietético y opcionalmente se puede incorporar directamente en un componente de alimento o pienso (por ejemplo, un suplemento alimenticio).

Los ejemplos de alimentos en los que los lípidos producidos por los métodos descritos en el presente documento se pueden incorporar incluyen comidas para mascotas tales como comida para gatos; comida para perros y similares; piensos para peces de acuario, peces de criadero o crustáceos, etc.; alimento para animales criados en granjas (incluyendo ganado y peces o crustáceos criados en acuicultura). El material de alimento o pienso en el que los lípidos producidos según los métodos descritos en el presente documento se pueden incorporar es preferentemente sabroso para el organismo que es el receptor previsto. Este material de alimento o pienso puede tener cualquier propiedad física actualmente conocida para un material de alimento (por ejemplo, sólido, líquido, blando).

Opcionalmente, se puede incorporar uno o más de los compuestos producidos (por ejemplo, PUFA) en un producto nutracéutico o farmacéutico. Los ejemplos de dichos productos nutracéuticos o farmacéuticos incluyen diversos tipos de comprimidos, cápsulas, agentes bebibles, etc. Opcionalmente, el producto nutracéutico o farmacéutico es adecuado para administración tópica. Las formas farmacéuticas pueden incluir, por ejemplo, cápsulas, aceites, gránulos, microgránulos, polvos, comprimidos, píldoras, trociscos, o similares.

El aceite o lípidos producidos según los métodos descritos en el presente documento se pueden incorporar en productos como se describe en el presente documento en combinación con cualquiera de una variedad de otros agentes. Por ejemplo, dichos compuestos se pueden combinar con uno o más aglutinantes o cargas, agentes quelantes, pigmentos, sales, tensioactivos, hidratantes, modificadores de la viscosidad, espesantes, emolientes, fragancias, conservantes, etc., o cualquier combinación de los mismos.

Como se usa todo el tiempo, los intervalos (por ejemplo, 1-10) y referencias a aproximadamente un valor dado (por ejemplo, aproximadamente 1 o aproximadamente 10) incluyen el valor o valores citados (por ejemplo, 1 y/o 10).

Los ejemplos a continuación pretenden ilustrar adicionalmente ciertos aspectos de los métodos y composiciones descritos en el presente documento, y no pretenden limitar el alcance de las reivindicaciones.

## Ejemplos

### 50 Ejemplo 1. Fermentación semicontinua repetida para la producción de biomasa y aceite

En el campo de la producción de aceites microbianos, la fermentación heterotrófica (oscura), en general, se considera superior al cultivo microbiano autotrófico en términos de la eficiencia de proceso y el rendimiento de producto. Sin embargo, se evita frecuentemente por mayor coste de capital fijo (el coste de construir una planta de fermentación basada en recipientes es, en general, muy superior al gasto de capital de sistemas de cultivos de tipo estanques abiertos y de canales). Usando un proceso de producción semicontinuo repetido, se pueden obtener mayores productividades volumétricas globales que reducen los costes de operación. Esto se logra minimizando el tiempo de descarga y carga del recipiente de producción y minimizando el uso de energía asociado a un cultivo de semillas y esterilización del recipiente de producción. Esto significa mejor utilización de las inversiones de capital fijo (fermentador y equipo asociado) y mayor capacidad de producción anual. También es una inversión reducida de capital ya que solo se usa un cultivo de semillas inicial.

La Figura 1 muestra la progresión de la concentración de biomasa y concentración de aceite en el recipiente con el tiempo durante una fermentación semicontinua repetida en un fermentador de 30 L. Para este experimento, se empleó

10 % de volumen residual usando glucosa como fuente de carbono. En la Figura 2, se usó un tiempo de descarga y carga lote a lote de 12 horas para calcular las productividades de cada operación semicontinua independiente, y se usó el mismo tiempo de descarga y carga de 12 horas para calcular el primer lote de la operación semicontinua repetida. Como se observa en la Figura 2, las productividades de biomasa y aceite de un proceso semicontinuo típico  
 5 permanecerán constantes con el tiempo, debido a que cada proceso semicontinuo posterior opera independientemente del lote previo con un tiempo de descarga y carga fijo integrado entre cada proceso semicontinuo. En cambio, después del primer ciclo del proceso semicontinuo repetido aumenta la productividad promedio, superando con creces la del proceso semicontinuo ya que no se requiere el tiempo de descarga y carga, y disminuye el tiempo de ciclo debido a la elevada densidad de semillas.

10

La Figura 3 muestra la progresión de la concentración de biomasa y concentración de aceite en el recipiente con el tiempo durante una fermentación semicontinua repetida en un fermentador de 7 L. Para este experimento, se empleó 20 % de volumen residual usando glucosa como fuente de carbono. En la Figura 4, se usó un tiempo de descarga y carga lote a lote de 12 horas para calcular las productividades de cada operación semicontinua independiente, y se  
 15 usó el mismo tiempo de descarga y carga de 12 horas para calcular el primer lote de la operación semicontinua repetida. Como se observa en la Figura 4, las productividades de biomasa y aceite de un proceso semicontinuo típico permanecerán constantes con el tiempo, debido a que cada proceso semicontinuo posterior opera independientemente del lote previo con un tiempo de descarga y carga fijo integrado. En cambio, después del primer ciclo del proceso semicontinuo repetido aumenta la productividad promedio, superando con creces la del proceso  
 20 semicontinuo ya que no se requiere el tiempo de descarga y carga, y disminuye el tiempo de ciclo debido a la elevada densidad de semillas.

Se llevaron a cabo fermentaciones semicontinuas repetidas con diferentes volúmenes de semilla residual, es decir, 20 %, 30 % y 40 %, durante un periodo de 320 horas, alcanzando cada uno un total de seis operaciones repetidas. Como  
 25 se observa en la Figura 5, todas las fermentaciones semicontinuas repetidas generaron mayores productividades de biomasa y aceite promedio global cuando se comparó con las de la operación semicontinua individual. El aumento del volumen de semilla residual desde 20 % hasta 30 % produjo un aumento significativo en las productividades promedio; mientras que un aumento adicional en el volumen de semilla residual desde 30 % hasta 40 % no provocó productividad adicional. Esto mostró el intercambio entre biomasa dejada sin recoger (es decir, usada como volumen residual para  
 30 semilla), y tiempo reducido gastado en la fase de latencia de la fermentación posterior. En estas condiciones, el punto de intercambio óptimo es aproximadamente 30 % del volumen de semilla residual.

#### Listado de secuencias

35 <110> Mara Renewables Corporation  
 <120> Métodos de cultivo semicontinuo repetido  
 <130> 095523-0960120 (012WO1)  
 40 <150> 62/064.694  
 <151> 16-10-2014  
 <160> 1  
 45 <170> PatentIn versión 3.5  
 <210> 1  
 <211> 1723  
 50 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 55 <400> 1

ES 2 785 331 T3

gtagtcatac gctcgtctca aagattaagc catgcatgtg taagtataag cgattatact 60  
 gtgagactgc gaacggctca ttatatcagt tatgatttct toggatattt ctttatatgg 120  
 atacctgcag taattctgga attaatacat gctgagaggg cccgactgtt cgggagggcc 180  
 gcacttatta gagtgaagc caagtaagat ggtgagtcac gataattgag cagatcgctt 240  
 gtttgagcgc atgaatcgtt tgagtttctg ccccatcagt tgtcgcggtt agtgtattgg 300  
 actacggtga ctataacggg tgacggggag ttagggctcg actccggaga gggagcctga 360  
 gagacggcta ccacatcca ggaaggcagc aggcgcgtaa attacccaat gtggactcca 420  
 cgaggtagtg acgagaaata tcaatgcggg gcgcttcgcg tcttgctatt ggaatgagag 480  
 caatgtaaaa ccctcatcga ggatcaactg gagggcaagt ctgggtgccag cagccgcggt 540  
 aattccagct ccagaagcgt atgctaaagt tgttgacgtt aaaaagctcg tagttgaatt 600  
 tctggggcgg gagccccggt ctttgccgca ctgcgctctg tttgccgagc ggctcctctg 660  
 ccacctctgc ctctttttt agtggcgtcg ttcaactgta ttaaagcaga gtgtccaag 720  
 caggtcgtat gacctggatg tttattatgg gatgatcaga tagggctcgg gtgctatttt 780  
 gttggtttgc acatctgagt aatgatgaat aggaacagtt ggggtattc gtatttagga 840  
 gctagaggtg aaattcttgg atttccgaaa gacgaactac agcgaaggca tttaccaagc 900  
 atgttttcat taatcaagaa cgaaagtctg gggatcgaag atgattagat accatcgtag 960  
 tctagaccgt aaacgatgcc gacttgcatg tgcgggggtt ttgtattgga ccctcgcagc 1020  
 agcacatgag aatcaaagt ctttgggttc cggggggagt atggtcgcaa ggctgaaact 1080  
 taaaggaatt gacggaaggg caccaccagg agtggagcct gcggcttaat ttgactcaac 1140  
 acgggaaaac ttaccaggtc cagacatagg taggattgac agattgagag ctctttcttg 1200  
 attctatggg tgggtgtgca tggccgttct tagttggtgg agtgatttgt ctggttaatt 1260  
 ccgttaacga acgagacctc ggcctactaa atagcgggtg gtatggcgac atacttgcgt 1320  
 acgcttctta gagggacatg ttcggtatac gagcaggaag ttcgaggcaa taacaggtct 1380  
 gtgatgccct tagatgttct gggccgcacg cgcgctacac tgatgggttc aacgggtggt 1440  
 catcgttggt cgcagcgagg tgctttgccg gaaggcatgg caaatccttt caacgcccac 1500  
 cgtgctgggg ctagattttt gcaattatta atctccaac aggaattcct agtaaacgca 1560  
 agtcatcagc ttgcattgaa tacgtccctg ccctttgtac acaccgcccg tcgcacctac 1620  
 cgattgaacg gtccgatgaa accatgggat gaccttttga gcgtttgttc gcgagggggg 1680  
 tcagaactcg ggtgaatctt attgtttaga ggaagggtgaa gtc 1723

## REIVINDICACIONES

1. Un método de cultivo semicontinuo repetido de un microorganismo *Thraustochytrid* productor de aceite que comprende las etapas de:
- 5 (a) proporcionar un recipiente que comprende uno o más microorganismos *Thraustochytrid* productores de aceite y medio, en donde los microorganismos *Thraustochytrid* productores de aceite y el medio forman un volumen de partida;
- 10 (b) cultivar los microorganismos *Thraustochytrid* productores de aceite en el medio en el recipiente:
- 15 i. cultivando los microorganismos *Thraustochytrid* productores de aceite en condiciones que favorecen la producción de biomasa; y
- ii. cultivando los microorganismos *Thraustochytrid* productores de aceite de la etapa (i) en condiciones que favorecen la producción de lípidos hasta que el cultivo completa la fermentación y alcanza un volumen umbral cuando se completa la fermentación, en donde el cultivo comprende añadir una o más fuentes de carbono al cultivo;
- (c) recoger una porción del volumen umbral del recipiente para dejar un volumen residual en el recipiente que es del 20 % al 40 % del volumen de partida;
- 20 (d) añadir medio fresco al recipiente en una cantidad para que el volumen del cultivo sea el volumen de partida; y
- (e) repetir las etapas (b), (c) y (d).
2. El método de la reivindicación 1, en donde el volumen residual es del 20 % al 30 % del volumen de partida.
- 25 3. El método de la reivindicación 1, en donde el volumen residual es del 30 % al 40 % del volumen de partida.
4. El método de la reivindicación 1, en donde el volumen residual es al menos aproximadamente el 30 % del volumen de partida.
- 30 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende además detectar durante la etapa (b) (ii) el volumen del cultivo, la densidad óptica (DO), el oxígeno disuelto (OD), la concentración de células, la velocidad de producción de dióxido de carbono, el pH, el tiempo, la concentración de nutriente en el medio de cultivo, la productividad de biomasa, la productividad de aceite, o cualquier combinación de los mismos.
- 35 6. El método de la reivindicación 5, en donde se detecta la concentración de nutriente en el medio de cultivo y en donde el nutriente es carbono o nitrógeno.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde las etapas se repiten dos o más veces.
- 40 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde las etapas se repiten 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende además aislar aceite de la porción recogida del volumen umbral.
- 45 10. El método de la reivindicación 9, en donde el aceite comprende ácidos grasos seleccionados del grupo que consiste en ácido alfa-linolénico, ácido araquidónico, ácido docosahexaenoico, ácido docosapentaenoico, ácido eicosapentaenoico, ácido gamma-linolénico, ácido linoleico, ácido linolénico, y combinaciones de los mismos.
11. El método de la reivindicación 9, en donde el aceite comprende triglicéridos.
- 50 12. El método de la reivindicación 9, en donde el aceite comprende ácidos grasos seleccionados del grupo que consiste en ácido palmítico (C16:0), ácido mirístico (C14:0), ácido palmitoleico (C16:1(n-7)), ácido cis-vaccénico (C18:1(n-7)), ácido docosapentaenoico (C22:5(n-6)), ácido docosahexaenoico (C22:6(n-3)), y combinaciones de los mismos.
- 55 13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde el microorganismo es de la familia *Thraustochytriaceae*, en donde opcionalmente el microorganismo es del género *Thraustochytrium*, en donde preferentemente el microorganismo tiene N° de acceso de ATCC PTA-6245.

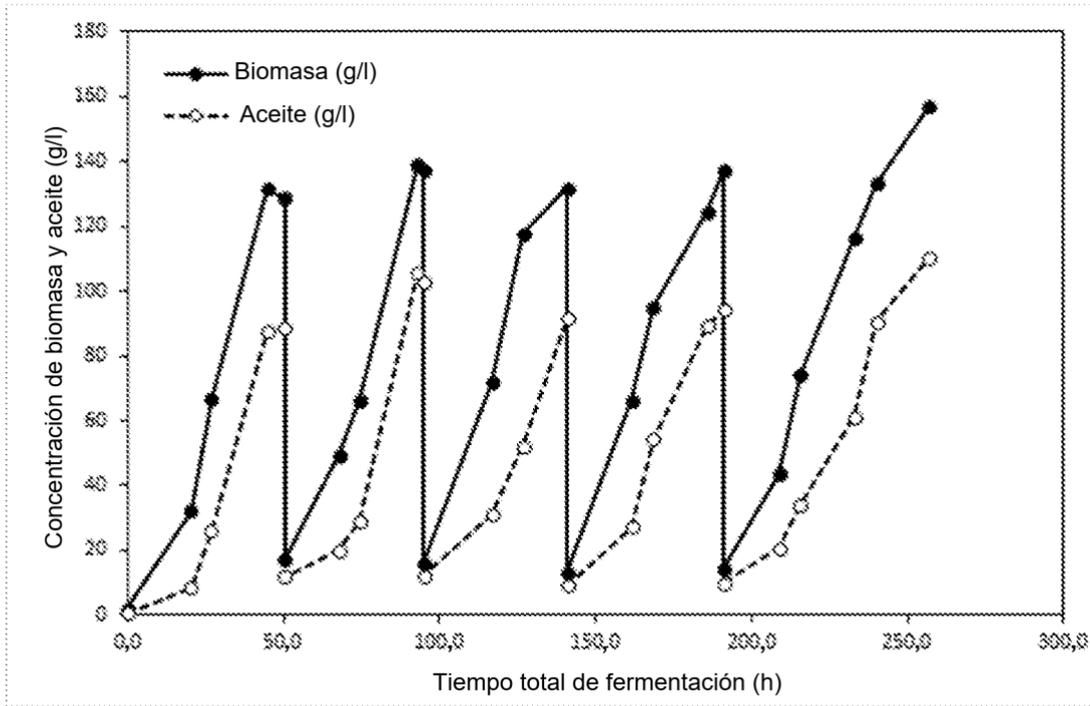


FIG. 1

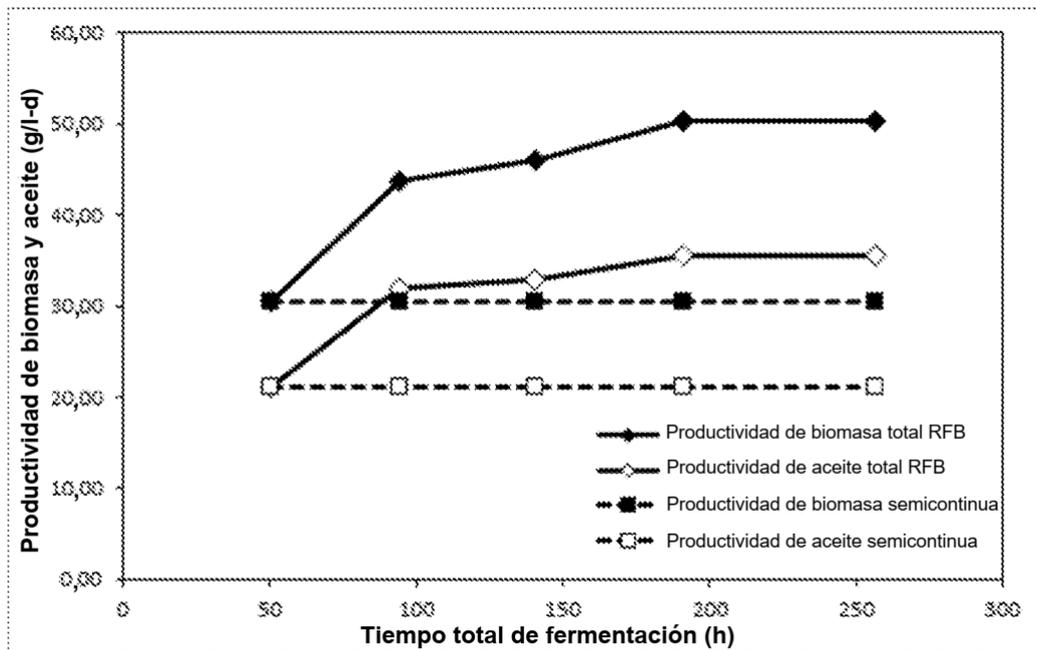


FIG. 2

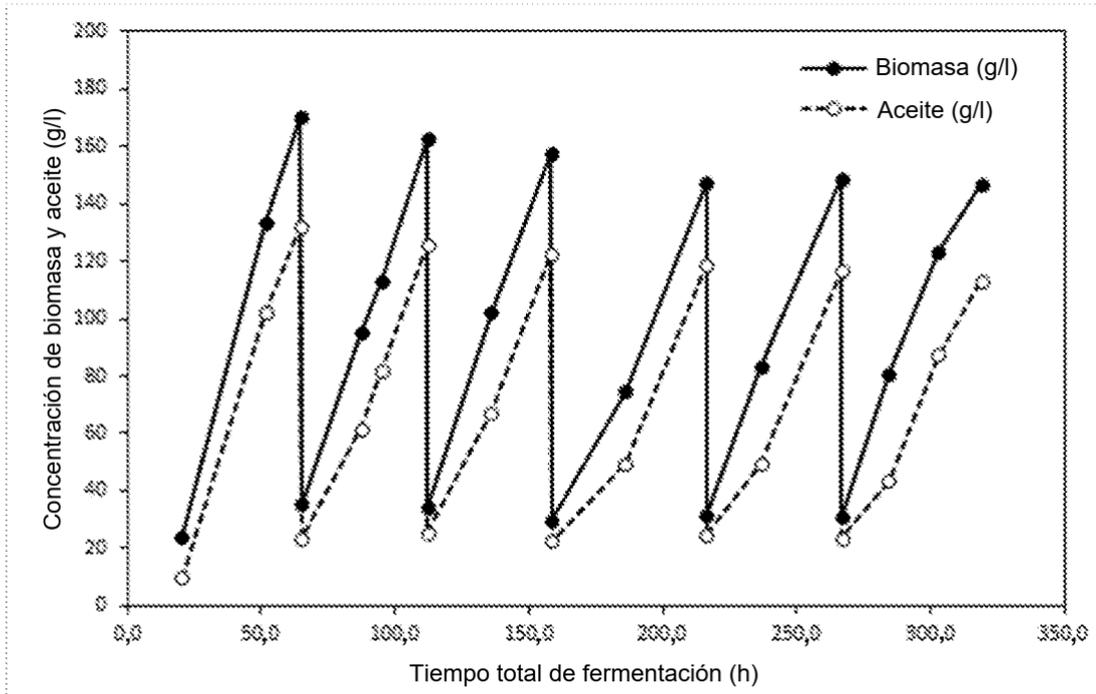


FIG. 3

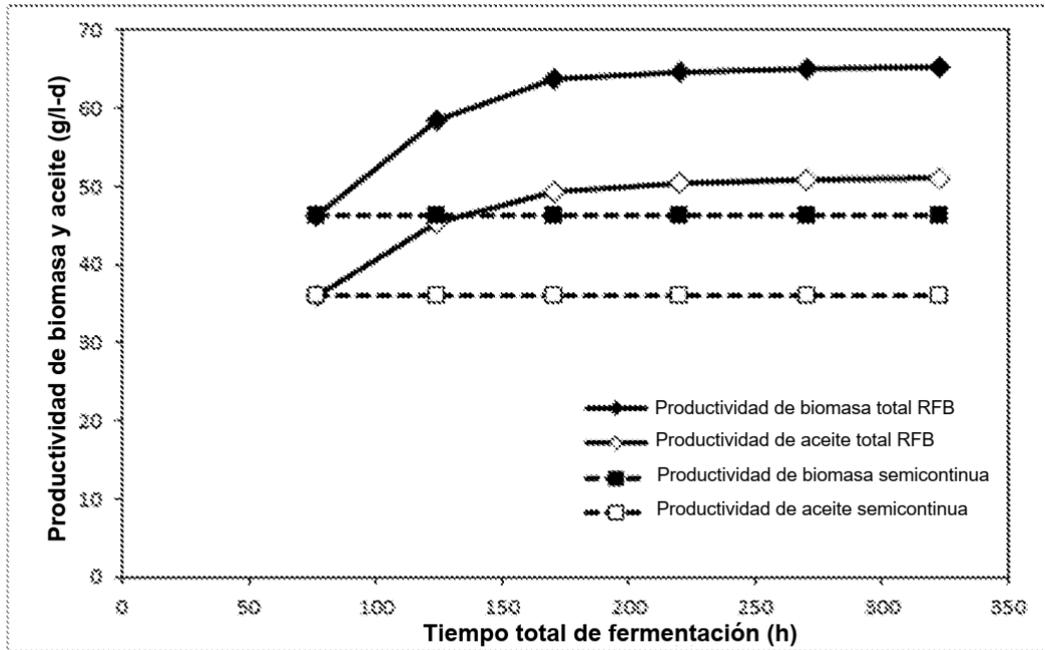


FIG. 4

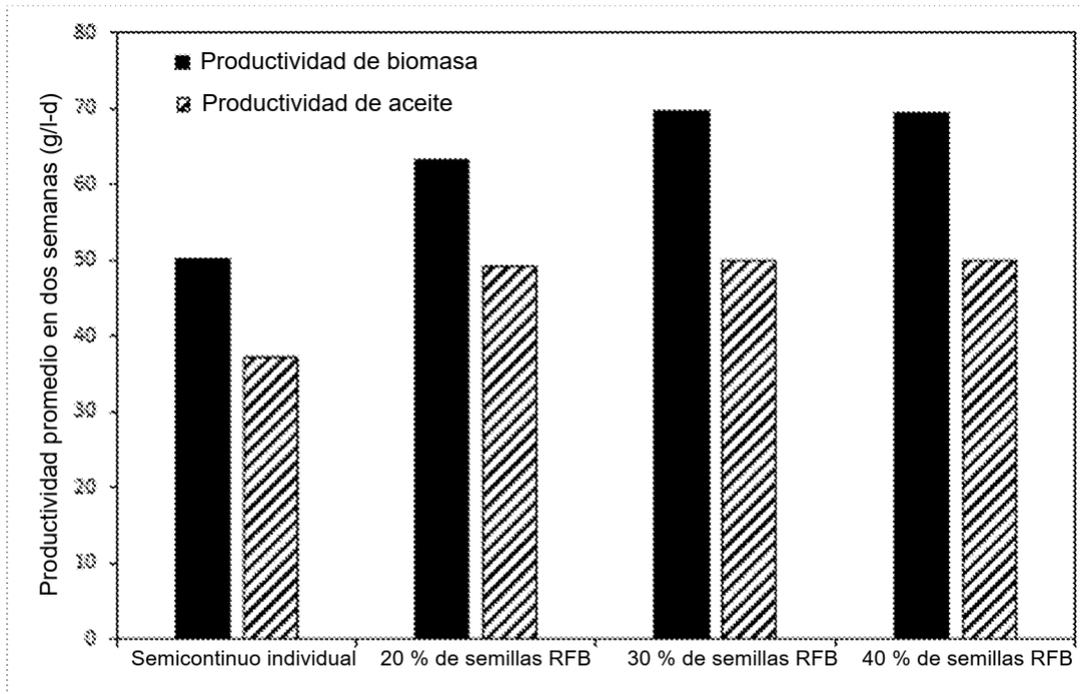


FIG. 5

## 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

- 10 • WO 2010097809 A2 [0005]  
 • WO 2011011660 A2 [0007]  
 • US 5340594 A [0011]  
 • US 5340742 A [0011] [0024]  
 • US 8163515 B [0011] [0037]  
 15 • US 20090117194 A [0021]  
 • US 20120244584 A [0021]  
 • US 6607900 B [0024]  
 • WO 62064694 A [0051]

## 20 Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- **X.-J.JI et al.** Efficient arachidonic acid-rich oil production by *Mortierella alpina* through a repeated fed-batch fermentation strategy. *Bioresource Technology*, 2014, vol. 170, 356-360 [0003]
- **ZHAO et al.** Lipid production by *Rhodospiridium toruloides* Y4 using different substrate feeding strategies. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2011, vol. 38, 627-632 [0004]
- 25 • **HEKMAT et al.** Optimization of the microbial synthesis of dihydroxyacetone from glycerol with *Gluconobacter oxydans*. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2003, vol. 26, 109-116 [0006]
- Optimization of the microbial synthesis of dihydroxyacetone in a semi-continuous repeated-fed-batch process by in situ immobilization of *Gluconobacter oxydans*. *Process Biochemistry*, 2007, vol. 42, 71-76 [0006]