

(11) Número de Publicação: **PT 1251744 E**

(51) Classificação Internacional:

A23B 7/10 (2006.01) **A23D 9/00** (2006.01)
C12N 1/00 (2006.01) **C12P 7/64** (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2001.01.26**

(30) Prioridade(s): **2000.01.28 US 178588 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2002.10.30**

(45) Data e BPI da concessão: **2007.10.03**
117/2007

(73) Titular(es):

MARTEK BIOSCIENCES CORPORATION
6480 DOBBIN ROAD COLUMBIA, MD 21045 US

(72) Inventor(es):

CRAIG M. RUECKER US
DON DIMASI US
JON M. HANSEN US
PETER J. MIRRASOUL US
RICHARD B. BAILEY US

(74) Mandatário:

PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA
RUA DO PATROCÍNIO, N.º 94 1399-019 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **PRODUÇÃO MELHORADA DE LÍPIDOS CONTENDO ÁCIDOS GORDOS
POLIÊNÓICOS ATRAVÉS DE CULTURAS DE ALTA DENSIDADE DE MICRÓBIOS EUCARIÓTICOS
EM FERMENTADORES**

(57) Resumo:

RESUMO

"PRODUÇÃO MELHORADA DE LÍPIDOS CONTENDO ÁCIDOS GORDOS POLIENÓICOS ATRAVÉS DE CULTURAS DE ALTA DENSIDADE DE MICRÓBIOS EUCARIÓTICOS EM FERMENTADORES"

A presente invenção proporciona um processo para o cultivo de microrganismos eucarióticos que são capazes de produzir lípidos, em particular, lípidos contendo ácidos gordos polienólicos. A presente invenção também proporciona um processo para a produção de lípidos microbianos eucarióticos.

DESCRIÇÃO

"PRODUÇÃO MELHORADA DE LÍPIDOS CONTENDO ÁCIDOS GORDOS POLIENÓICOS ATRAVÉS DE CULTURAS DE ALTA DENSIDADE DE MICRÓBIOS EUCARIÓTICOS EM FERMENTADORES"

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção é dirigida a um novo processo para o crescimento de microrganismos e a recuperação de lípidos microbianos. Em particular, A presente invenção é dirigida à produção de lípidos polinsaturados microbianos.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Crê-se, de forma geral, que a produção de ácidos gordos polienólicos (ácidos gordos contendo 2 ou mais ligações carbono-carbono insaturadas) em microrganismos eucarióticos requer a presença de oxigénio molecular (*i. e.*, condições aeróbias). Isto é porque se acredita que a ligação dupla *cis* formada nos ácidos gordos de todos os microrganismos eucarióticos não parasitários envolve uma reacção directa de dessaturação dependente de oxigénio (sistemas microbianos oxidativos de desaturase). Outros lípidos microbianos eucarióticos que são conhecidos por requererem o oxigénio molecular incluem esteróides fúngicos e vegetais, oxicarotenóides (*i. e.*, xantofilas), ubiquinonas, e compostos feitos a partir de alguns destes lípidos (*i. e.*, metabolitos secundários).

Foi demonstrado que determinados micróbios eucarióticos (tais como algas; fungos, incluindo leveduras; e protistas) são bons produtores de ácidos gordos polienólicos em fermentadores. Contudo, o cultivo a densidade muito elevada (maior do que cerca de 100 g/L de biomassa microbiana, especialmente na escala comercial) pode conduzir a teores diminuídos de ácidos gordos polienólicos e, deste modo, a produtividade diminuída de ácidos gordos polienólicos. Isto pode ser devido, em parte, a vários factores incluindo a dificuldade de manter os níveis elevados de oxigénio dissolvido devido à procura elevada de oxigénio desenvolvida pela concentração elevada de micróbios no caldo de fermentação. Os métodos para manter um nível mais elevado de oxigénio dissolvido incluem o aumento da taxa de arejamento e/ou a utilização de oxigénio puro em vez de ar para o arejamento e/ou o aumento da taxa de agitação no fermentador. Estas soluções aumentam geralmente o custo da produção de lípidos e o custo capital de equipamento de fermentação, e podem causar problemas adicionais. Por exemplo, o arejamento aumentado pode facilmente conduzir a problemas graves de formação de espuma no fermentador a densidades celulares elevadas e a agitação aumentada pode conduzir à ruptura das células microbianas devido às forças de cisalhamento aumentadas no caldo de fermentação (esta faz com que os lípidos sejam libertados no caldo de fermentação onde se podem oxidar e/ou degradar através de enzimas). A ruptura das células microbianas é um problema crescente em células que sofreram limitação ou depleção de azoto para induzir a formação de lípidos, resultando em paredes celulares mais fracas.

Como resultado, quando micróbios eucarióticos produtores de lípidos são cultivados em concentrações celulares muito elevadas, os seus lípidos contêm geralmente apenas quantidades muito pequenas de ácidos gordos polienólicos. Por exemplo, a levedura *Lipomyces starkeyi* foi cultivada a uma densidade de

153 g/L com concentração resultante de lípidos de 83 g/L em 140 horas utilizando álcool como uma fonte de carbono. Contudo, o conteúdo de ácidos gordos polienólicos da levedura a concentração superior a 100 g/L apenas atingiu em média 4,2% dos ácidos gordos totais (caindo do elevado 11,5% de ácidos gordos totais a uma densidade celular de 20-30 g/L). Yamauchi et al., J. Ferment. Technol., 1983, 61, 275-280. Isto resulta num concentração de ácidos gordos polienólicos de apenas cerca de 3,5 g/L e uma produtividade média de ácidos gordos polienólicos de apenas cerca de 0,025 g/L/h. Adicionalmente, o único ácido gordo polienólico descrito nos lípidos de levedura foi C18:2.

Foi demonstrado que outra levedura, *Rhodotorula glutinus*, possui uma produtividade média de lípidos de cerca de 0,49 g/L/h, mas também um conteúdo total baixo de ácidos gordos polienólicos nos seus lípidos (15,8% de ácidos gordos totais, 14,7% de C18:2 e 1,2% de C18:3) resultando numa produtividade de ácidos gordos polienólicos na cultura em descontínuo de apenas cerca de 0,047 g/L/h e 0,077 g/L/h em cultura contínua.

Um dos presentes inventores demonstrou previamente que determinadas microalgas marinhas da ordem *Thraustochytriales* podem ser excelentes produtores de ácidos gordos polienólicos em fermentadores, especialmente quando cultivados a níveis baixos de salinidade e, especialmente, a níveis muito baixos de cloreto. Outros descreveram *Thraustochytriales* que apresentam uma produtividade média de ácidos gordos polienólicos (DHA, C22:6n-3; e DPA, C22:5n-6) de cerca de 0,158 g/L/h, quando cultivados a uma densidade celular de 59 g/L em 120 horas. Contudo, esta produtividade foi apenas conseguida a uma salinidade de cerca de 50% da água do mar, uma concentração que iria causar corrosão grave em fermentadores convencionais de aço inoxidável.

Os custos de produzir lípidos microbianos contendo ácidos gordos polienólicos, e especialmente de ácidos gordos muito insaturados, tais como C18:4n-3, C20:4n-6, C20:5n3, C22:5n-3, C22:5n-6 e C22:6n-3, têm permanecido elevados em parte devido às densidades limitadas a que os micróbios eucarióticos contendo elevados ácidos gordos polienólicos foram cultivados e à disponibilidade limitada de oxigénio tanto a estas concentrações celulares elevadas como às temperaturas elevadas necessárias para conseguir produtividade elevada.

Deste modo, existe a necessidade de um processo para o crescimento de microrganismos a concentração elevada que ainda facilite a produção aumentada de lípidos contendo ácidos gordos polienólicos.

O documento WO-A-92/13086 divulga um método para a produção de um óleo contendo ácido araquidónico substancialmente livre de ácido eicosapentaenólico, compreendendo o cultivo de uma espécie de *Pythium* que produz um óleo araquidónico substancialmente livre de ácido eicosapentaenólico sob condições adequadas de cultura produtora de óleo; a recolha do referido *Pythium*; a extracção do referido óleo do referido *Pythium* recolhido, e a recuperação do referido óleo.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

De acordo com um aspecto da presente invenção é proporcionado um processo para a produção de lípidos microbianos compreendendo:

(a) realização de uma fermentação de um meio compreendendo microrganismos, uma fonte de carbono e uma fonte de nutriente limitante e proporcionar condições suficientes para manter um nível de oxigénio dissolvido de, pelo menos, cerca de 4% de saturação no referido meio de fermentação para aumentar a densidade da biomassa;

(b) proporcionar subsequentemente condições suficientes para manter um nível de oxigénio dissolvido de cerca de 1% ou menos, de saturação no referido meio de fermentação e proporcionar condições suficientes para permitir aos referidos microrganismos produzirem os referidos lípidos; e

(c) recuperar os referidos lípidos microbianos,

em que, pelo menos, cerca de 15% dos referidos lípidos microbianos são lípidos polinsaturados; e

em que é conseguida uma densidade de biomassa de, pelo menos, 100 g/L durante a fermentação.

De acordo com outro aspecto da presente invenção é proporcionado um processo para enriquecer o conteúdo de ácidos gordos polienólicos de um microrganismo compreendendo a fermentação do referido microrganismo num meio de crescimento que tem um nível de oxigénio dissolvido de menos de 1% de saturação.

De acordo com um aspecto adicional da presente invenção é proporcionado um processo heterotrófico para a produção de produtos e microrganismos, compreendendo o cultivo dos referidos microrganismos num meio de cultura que tem um nível de oxigénio dissolvido de menos do que cerca de 1% de saturação, em que os referidos microrganismos contêm genes da policétido sintase.

É também divulgado um processo para o cultivo de microrganismos eucarióticos que são capazes de produzir, pelo menos, cerca de 20% da sua biomassa como lípidos e um método para a produção de lípidos. De um modo preferido, os lípidos contêm um ou mais ácidos gordos polienólicos. As formas de realização do processo compreendem a adição a um meio de fermentação compreendendo microrganismos eucarióticos, uma fonte de carbono, de um modo preferido, uma fonte de carbono não alcoólica, e uma fonte de nutriente limitante. De um modo preferido, a fonte de carbono e a fonte de nutriente limitante são adicionados a uma taxa suficiente para aumentar a densidade de biomassa do meio de fermentação até, pelo menos, cerca de 100 g/L.

Numa forma de realização da presente invenção, a condição de fermentação compreende uma fase de aumento de densidade de biomassa e uma fase de produção de lípidos, em que a fase de aumento de densidade de biomassa compreende a adição da fonte de carbono e da fonte de nutriente limitante de azoto, e a fase de produção de lípidos compreende a adição da fonte de carbono sem adicionar a fonte de nutriente limitante para criar as condições que induzem a produção de lípidos.

Noutra forma de realização da presente invenção, a quantidade de oxigénio dissolvido presente no meio de fermentação durante a fase de produção de lípidos é mais baixa do que a quantidade de oxigénio dissolvido presente no meio de fermentação durante a fase de aumento de densidade de biomassa.

Ainda noutra forma de realização da presente invenção, os microrganismos são seleccionados do grupo consistindo em algas, fungos (incluindo leveduras), protistas, bactérias e suas misturas, em que os microrganismos são capazes de produzir os

ácidos gordos polienólicos ou outros lípidos que se acredita, de forma geral, requererem oxigénio molecular para a sua síntese. Os microrganismos particularmente úteis da presente invenção são microrganismos eucarióticos que são capazes de produzir lípidos a um nível de oxigénio no meio de fermentação de cerca de menos de 3% de saturação.

Ainda noutra forma de realização da presente invenção, os microrganismos são cultivados num processo em descontínuo.

Contudo, ainda outra forma de realização da presente invenção proporciona a manutenção de um nível de oxigénio de menos de cerca de 3% de saturação no meio de fermentação durante a segunda metade do processo de fermentação.

É também divulgado um processo para a produção de lípidos microbianos eucarióticos compreendendo:

(a) cultivo de microrganismos eucarióticos num meio de fermentação para aumentar a densidade de biomassa do referido meio de fermentação até, pelo menos, cerca de 100 g/L;

(b) proporcionar condições de fermentação suficientes para permitir que os referidos microrganismos produzam os referidos lípidos; e

(c) recuperar os referidos lípidos,

em que mais do que cerca de 15% de referidos lípidos são lípidos polinsaturados.

Outro aspecto da presente invenção proporciona um processo de recuperação de lípidos que compreende:

(d) remoção da água do referido meio de fermentação para proporcionar microrganismos secos; e

(e) isolamento dos referidos lípidos a partir dos microrganismos secos.

De um modo preferido, o passo de remoção da água compreende colocar em contacto o meio de fermentação directamente num secador de tambor sem centrifugação prévia. Outra forma de realização da presente invenção proporciona um processo de recuperação de lípidos que compreende:

(d) o tratamento do caldo de fermentação para permeabilizar, lisar ou quebrar as células microbianas; e

(e) a recuperação dos lípidos do caldo de fermentação através de separação gravimétrica, e de um modo preferido, centrifugação, com ou sem a ajuda de um solvente hidrossolúvel para ajudar a quebrar a emulsão lípido/água.

De um modo preferido, as células microbianas são tratadas no passo (c) num fermentador ou num recipiente semelhante.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura I é uma tabela e um gráfico de vários parâmetros de produção de lípidos de um microrganismo *versus* a quantidade de oxigénio dissolvido num meio de fermentação.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona um processo para o cultivo de microrganismos, tais como, por exemplo, algas, fungos (incluindo levedura), protistas e bactérias. De um modo preferido, os microrganismos são seleccionados do grupo consistindo em algas, protistas e suas misturas. De um modo mais preferido, os microrganismos são algas. Além disso, processo da presente invenção pode ser utilizado para a produção de uma variedade de compostos lipídicos, em particular lípidos insaturados, de um modo preferido lípidos polinsaturados (*i. e.*, lípidos contendo, pelo menos, 2 ligações carbono-carbono insaturadas, *e. g.*, ligações duplas), e de um modo mais preferido lípidos muito insaturados (*i. e.*, lípidos contendo 4 ou mais ligações carbono-carbono insaturadas) tais como ácidos gordos polinsaturados omega-3 e/ou omega-6, incluindo ácido docosa-hexaenóico (*i. e.*, DHA); e outros compostos insaturados, polinsaturados e muito insaturados naturais. Como aqui utilizado, o termo "lípidos" inclui fosfolípidos; ácidos gordos livres; ésteres de ácidos gordos; triacilgliceróis; esteróides e ésteres de esteróides; carotenóides; xantofilas (*e. g.*, oxicarotenóides); hidrocarbonetos; compostos derivados de isoprenóides e outros lípidos conhecidos de um especialista na técnica.

Mais particularmente, os processos da presente invenção são úteis na produção de ácidos gordos polienólicos microbianos eucarióticos, carotenóides, esteróides fúngicos, fitoesteróides, xantofilas, ubiquinonas e outros compostos derivados de isoprenóides que se acreditava, de forma geral, requererem oxigénio para a produção de ligações carbono-carbono insaturadas (*i. e.*, condições aeróbias), e seus metabolitos secundários. Especificamente, os processos da presente invenção são úteis no

cultivo de microrganismos que produzem ácido(s) gordo(s) polienóico(s), e para a produção de ácido(s) gordo(s) polienóico(s) microbiano(s).

Embora os processos da presente invenção possam ser utilizados para o cultivo de uma vasta variedade de microrganismos e para a obtenção de compostos contendo lípidos polinsaturados produzidos pelos mesmos, por questões de brevidade, conveniência e ilustração, esta descrição detalhada da invenção irá discutir processos para o cultivo de microrganismos que são capazes de produzir lípidos compreendendo ácidos gordos polinsaturados omega-3 e/ou omega-6, em particular microrganismos que são capazes de produzir DHA (ou compostos intimamente relacionados, tais como DPA, EPA ou ARA). Os microrganismos preferidos incluem microalgas, fungos (incluindo levedura), protistas e bactérias. Um grupo de microrganismos preferidos é o dos membros do grupo microbiano denominado *Stramenopiles* que inclui microalgas e microrganismos de tipo alga. O *Stramenopiles* inclui os seguintes grupos de microrganismos: Hamatores, Proteromonads, Opalines, Developayella, Diplophrys, Labrinthulids, Thraustochytrids, Biosecids, Oomycetes, Hypochytridiomycetes, Commation, Reticulosphaera, Pelagomonas, Pelagococcus, Ollicola, Aureococcus; Parmales, Diatoms, Xanthophytes, Phaeophytes (algas castanhas), Eustigmatophytes, Raphidophytes, Synurids, Axodines (incluindo Rhizochromulinales, Pedinellales, Dictyochales), Chrysomeridales, Sarcinochrysidales, Hydrurales, Hibberdiales e Chromulinales. Outros grupos preferidos de microalgas incluem os membros das algas verdes e dinoflagelados, incluindo membros do género *Cryptothecodium*. Mais particularmente, as formas de realização preferidas da presente invenção serão discutidas com referência a um processo para o cultivo de microrganismos marinhos, em particular algas, tais como Thraustochytrids da

ordem *Thraustochytriales*, mais especificamente *Thraustochytriales* do género *Thraustochytrium* e *Schizochytrium*, incluindo *Thraustochytriales* que é divulgado geralmente nas Patentes U.S. Nº 534,594 e 5340742 referenciadas, ambas concedidas à Barclay. Deve ser assinalado que muitos especialistas concordam que *Ulkenia* não é um género separado, mas é de facto parte do género *Schizochytrium*. Como aqui utilizado, o género *Schizochytrium* incluirá *Ulkenia*.

Os microrganismos preferidos são aqueles que produzem os compostos de interesse através de sistemas da policétido sintase. Tais microrganismos incluem os microrganismos que têm um sistema endógeno da policétido sintase e os microrganismos em que foi geneticamente manipulado um sistema da policétido sintase. Os policétidos são produtos naturais estruturalmente variados que têm uma vasta gama de actividades biológicas, incluindo propriedades antibióticas e farmacológicas. A biossíntese do esqueleto da cadeia de carbono dos policétidos é catalizada por policétido sintases. Tal como as sintases de ácidos gordos estruturalmente e mecanicamente relacionadas, as policétido sintases catalizam as condensações descarboxilativas repetidas entre os tioésteres de acilo que prolongam a cadeia de carbono dois carbonos de cada vez. Contudo, ao contrário das sintases de ácidos gordos, as policétido sintases podem gerar uma grande variabilidade estrutural no produto final. Os sistemas individuais da policétido sintase podem fazer isto através da utilização de unidades iniciais diferentes de acetato, por utilização de metil- ou etil-malonato como a unidade de prolongamento e por variação do ciclo redutivo de cetorredução, desidratação e redução de enóilo no grupo beta-ceto formado após cada condensação. É de particular interesse aqui que as ligações duplas de carbono-carbono que são introduzidas pelo passo de desidratação possam ser retidas no

produto final. Além disso, embora estas ligações duplas estejam inicialmente na configuração *trans*, elas podem ser convertidas na configuração *cis* encontrada em DHA (e outros ácidos gordos polienólicos de interesse) por isomerização enzimática. Ambas as reacções de desidratação e isomerização podem ocorrer na ausência de oxigénio molecular.

De um modo preferido, de acordo com a presente invenção é proporcionado um processo heterotrófico para a produção de produtos e microrganismos. O processo compreende, de um modo preferido, o cultivo dos microrganismos em meio de cultura em que os microrganismos contêm um sistema da policétido sintase. O nível de oxigénio dissolvido é mantido em menos de cerca de 1 por cento.

Assumindo uma taxa de produção de lípidos relativamente constante por uma alga, é prontamente evidente que a densidade mais elevada de biomassa conduzirá a uma quantidade total mais elevada de lípidos que são produzidos por volume. Os processos de fermentação convencionais actuais para o cultivo de algas produzem uma densidade de biomassa a partir de cerca de 50 a cerca de 80 g/L ou menos. Os presentes inventores verificaram que através da utilização de processos da presente invenção, pode ser conseguida uma densidade significativamente mais elevada de biomassa do que a densidade de biomassa actualmente conhecida. De um modo preferido, os processos da presente invenção produzem uma densidade de biomassa de, pelo menos, cerca de 100 g/L, de um modo mais preferido de, pelo menos, cerca de 130 g/L, ainda de um modo mais preferido de, pelo menos, cerca de 150 g/L, contudo ainda de um modo mais preferido de, pelo menos, cerca de 170 g/L, e de um modo muito preferido mais do que 200 g/L. Assim, com uma densidade de biomassa tão elevada, mesmo se a taxa de produção de lípidos de algas for ligeiramente diminuída, a taxa de produção de lípidos totais por

volume é significativamente superior do que os processos actualmente conhecidos.

Os processos da presente invenção para o cultivo de microrganismos da ordem Thraustochytriales incluem a adição de uma fonte de carbono e de uma fonte de um nutriente limitante a um meio de fermentação compreendendo os microrganismos, a uma taxa suficiente para aumentar a densidade de biomassa do meio de fermentação relativamente àquelas acima descritas. Como aqui utilizado, o termo "fonte de nutriente limitante" refere-se a uma fonte de um nutriente (incluindo o próprio nutriente) essencial para o crescimento de um microrganismo em que, quando o nutriente limitante é esgotado do meio de cultura, a sua ausência limita substancialmente o microrganismo de crescer ou replicar mais. Contudo, uma vez que os outros nutrientes estão ainda em abundância, o organismo pode continuar a fazer e a acumular produtos intracelulares e/ou extracelulares. Através da escolha de um nutriente limitante específico pode-se controlar o tipo de produtos que são acumulados. Deste modo, proporcionando uma fonte de nutriente limitante a uma determinada taxa permite o controlo da taxa de crescimento do microrganismo e a produção ou a acumulação de produtos desejados (e. g., lípidos). Este processo de fermentação, onde um ou mais substratos (e. g., uma fonte de carbono e uma fonte de nutriente limitante) são adicionados em incrementos, é geralmente referido como um processo de fermentação em descontínuo. Verificou-se que quando o substrato é adicionado a um processo de fermentação em descontínuo, a grande quantidade da fonte de carbono presente (e. g., cerca de 200 g/L ou mais por 60 g/L de densidade de biomassa) teve um efeito prejudicial nos microrganismos. Sem se estar limitado pela teoria, crê-se que uma tal quantidade tão elevada de fonte de carbono cause efeitos prejudiciais, incluindo stress osmótico, nos microrganismos e inibe a

produtividade inicial dos microrganismos. Os processos da presente invenção evitam este efeito prejudicial indesejado enquanto proporcionam uma quantidade suficiente do substrato para conseguir a densidade de biomassa acima descrita dos microrganismos.

Os processos da presente invenção para o cultivo de microrganismos podem incluir uma fase de aumento da densidade de biomassa. Na fase de aumento da densidade de biomassa, o objectivo principal do processo de fermentação é aumentar a densidade de biomassa no meio de fermentação para obter a densidade de biomassa acima descrita. A taxa de adição da fonte de carbono é mantida tipicamente a um nível ou gama particular que não cause um efeito prejudicial significativo na produtividade dos microrganismos, ou na viabilidade dos microrganismos resultando das potencialidades insuficientes do equipamento de fermentação para remover o calor e transferir gases de e para o caldo líquido. Uma gama apropriada da quantidade da fonte de carbono necessária para um microrganismo particular durante um processo de fermentação é bem conhecida de um especialista na técnica. De um modo preferido, uma fonte de carbono da presente invenção é uma fonte de carbono não alcoólica, *i. e.*, uma fonte de carbono que não contenha álcool. Como aqui utilizado, um "álcool" refere-se a um composto que tem 4 ou menos átomos de carbono com um grupo hidroxilo, *e. g.*, metanol, etanol e isopropanol, mas para o objectivo desta invenção não inclui hidroxiácidos orgânicos, tais como ácido láctico e compostos semelhantes. De um modo mais preferido, uma fonte de carbono da presente invenção é um hidrato de carbono, incluindo, mas não limitado a, frutose, glucose, sacarose, melaço e amido. Outras fontes simples e complexas adequadas de carbono e fontes de azoto são divulgadas nas patentes acima referenciadas. Tipicamente, contudo, é utilizado um hidrato de carbono, de um modo preferido xarope de milho, como a fonte

primária de carbono. Os ácidos gordos, na forma de hidroxíácidos gordos, triglicéridos, e di- e monoglicéridos podem também servir como a fonte de carbono

As fontes particularmente preferidas de azoto são a ureia, nitrato, nitrito, proteína de soja, aminoácidos, extracto proteico de maceração do milho, extracto de levedura, subprodutos animais, sal de amónio inorgânico, de um modo mais preferido sais de amónio de sulfato, hidróxido, e de um modo muito preferido, hidróxido de amónio. Outras fontes de nutrientes limitantes incluem fontes de carbono (como acima definido), fontes de fosfato, fontes de vitamina (tais como fontes de vitamina B₁₂, fontes de pantotenato, fontes de tiamina), e fontes de metais vestigiais (tais como fontes de zinco, fontes de cobre, fontes de cobalto, fontes de níquel, fontes de ferro, fontes de manganês, fontes de molibdénio), e fontes de metais principais (tais como fontes de magnésio, fontes de cálcio, fontes de sódio, fontes de potássio e fontes de sílica, etc.). As fontes de metais vestigiais e as fontes de metais principais podem incluir sais de sulfato e cloreto destes metais (por exemplo, mas não limitados a, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; CaCl_2 ; K_2SO_4 ; KCl ; e Na_2SO_4).

Quando for utilizado amónio como uma fonte de azoto, o meio de fermentação torna-se ácido se não for controlado por adição de base ou tampões. Quando for utilizado hidróxido de amónio como a fonte primária de azoto, este pode ser também utilizado para proporcionar um controlo de pH. Os microrganismos da ordem *Thraustochytriales*, em particular *Thraustochytriales* do género *Thraustochytrium* e *Schizochytrium*, irão crescer ao longo de uma vasta gama de pH, e. g., a partir de cerca de pH 5 a cerca de pH 11. Uma gama apropriada de pH para a fermentação de um

microrganismo particular está no âmbito do conhecimento de um especialista na técnica.

Os processos da presente invenção para o cultivo de microrganismos podem também incluir uma fase de produção. Nesta fase, a utilização primária do substrato pelos microrganismos não é para aumentar a densidade de biomassa mas antes a utilização do substrato para a produção de lípidos. Deve ser entendido que os lípidos são também produzidos pelos microrganismos durante a fase de aumento da densidade de biomassa; contudo, como acima referido, o objectivo primário na fase de aumento da densidade de biomassa é aumentar a densidade de biomassa. Tipicamente, durante a fase de produção, a adição do substrato de nutriente limitante é reduzida ou de um modo preferido parada.

Acreditava-se anteriormente, de forma geral, que a presença de oxigénio dissolvido no meio de fermentação era crucial na produção de compostos polinsaturados, incluindo ácidos gordos polinsaturados omega-3 e/ou omega-6, por microrganismos eucarióticos. Assim, acreditava-se, de forma geral, ser preferida uma quantidade relativamente grande de oxigénio dissolvido no meio de fermentação. Contudo, surpreendentemente e inesperadamente, os presentes inventores verificaram que a taxa de produção de lípidos aumenta dramaticamente quando o nível de oxigénio dissolvido durante a fase de produção é reduzido. Assim, quando o nível de oxigénio dissolvido no meio de fermentação durante a fase de aumento da densidade de biomassa for, pelo menos, cerca de 4% de saturação, e de um modo preferido, pelo menos, cerca de 8% de saturação, durante a fase de produção, o oxigénio dissolvido no meio de fermentação é reduzido a cerca de 1% de saturação ou menos, e de um modo mais preferido a cerca de 0% de saturação. No começo da fermentação o OD pode estar em saturação ou perto disso e como os micróbios

crecem é permitido que desça para estes pontos de referência de OD baixos. Numa forma de realização particular da presente invenção, a quantidade do nível de oxigénio dissolvido no meio de fermentação varia durante o processo de fermentação. Por exemplo, para um processo de fermentação com um tempo total de fermentação de cerca de 90 horas a cerca de 100 horas, o nível de oxigénio dissolvido no meio de fermentação é mantido em cerca de 8% durante as primeiras 24 horas, cerca de 4% a partir de cerca da 24^a hora a cerca da 40^a hora, e cerca de 0,5% ou menos a partir de cerca da 40^a hora ao fim do processo de fermentação.

A quantidade de oxigénio dissolvido presente no meio de fermentação pode ser controlada através de controlo da quantidade de oxigénio no espaço livre do fermentador, ou de um modo preferido através do controlo da velocidade a que o meio de fermentação é agitado (ou misturado). Por exemplo, uma taxa elevada de agitação (ou mistura) resulta numa quantidade relativamente maior de oxigénio dissolvido no meio de fermentação do que uma taxa baixa de agitação. Por exemplo, num fermentador com uma capacidade de cerca de 14000 galões, a taxa de agitação é definida a partir de cerca de 50 rpm a cerca de 70 rpm durante as primeiras 12 horas, a partir de cerca de 55 rpm a cerca de 80 rpm durante cerca da 12^a hora a cerca da 18^a hora e a partir de cerca de 70 rpm a cerca de 90 rpm a partir de cerca da 18^a hora ao fim do processo de fermentação para conseguir o nível de oxigénio dissolvido discutido acima, para um tempo total do processo de fermentação a partir de cerca de 90 horas a cerca de 100 horas. Uma gama particular de velocidades de agitação necessária para conseguir uma quantidade particular de oxigénio dissolvido no meio de fermentação pode ser prontamente determinada por um especialista na técnica.

Uma temperatura preferida para processos da presente invenção é, pelo menos, cerca de 20 °C, de um modo mais

preferido, pelo menos, cerca de 25 °C, e de um modo muito preferido, pelo menos, cerca de 30 °C. Deve ser entendido que a água fria pode reter uma quantidade mais elevada de oxigénio dissolvido do que a água morna. Assim, uma temperatura do meio de fermentação mais elevada tem o benefício adicional de reduzir a quantidade de oxigénio dissolvido, que é particularmente desejada como acima descrito.

Determinados microrganismos podem requerer uma determinada quantidade de minerais salinos no meio de fermentação. Estes minerais salinos, especialmente iões de cloreto, podem causar corrosão do fermentador e de outro equipamento de processamento a jusante. Para prevenir ou reduzir estes efeitos indesejados devido a uma quantidade relativamente grande de iões de cloreto presentes no meio de fermentação, os processos da presente invenção podem também incluir sais de sódio não contendo cloreto, de um modo preferido sulfato de sódio, no meio de fermentação como uma fonte de sódio. Mais particularmente, uma porção significativa dos requisitos de sódio da fermentação é fornecida como sais de sódio não contendo cloreto. Por exemplo, menos do que cerca de 75% de sódio no meio de fermentação é fornecido como cloreto de sódio; de um modo mais preferido, menos do que cerca de 50% e, de um modo mais preferido, menos do que cerca de 25%. Os microrganismos da presente invenção podem ser cultivados em concentrações de cloreto de menos do que cerca de 3 g/L, de um modo mais preferido menos do que cerca de 500 mg/L, de um modo mais preferido menos do que cerca de 250 mg/L e de um modo mais preferido entre cerca de 60 mg/L e cerca de 120 mg/L.

Os sais de sódio não contendo cloreto incluem cinza de soda (uma mistura de carbonato de sódio e óxido de sódio), carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, sulfato de sódio e suas misturas, e incluem de um modo preferido sulfato de sódio. A

cinza de soda, carbonato de sódio e bicarbonato de sódio tendem a aumentar o pH do meio de fermentação, requerendo assim passos de controlo para manter o pH apropriado do meio. A concentração de sulfato de sódio é eficaz para atingir os requisitos de salinidade dos microrganismos, de um modo preferido a concentração de sódio é (expressa como g/L de Na), pelo menos, cerca de 1 g/L, de um modo mais preferido na gama a partir de cerca de 1 g/L a cerca de 50 g/L e, de um modo mais preferido, na gama a partir de cerca de 2 g/L a cerca de 25 g/L.

São discutidos em detalhe vários parâmetros de fermentação para inoculação, cultivo e recuperação de microrganismos na Patente U.S. Nº 5130242. Qualquer método de isolamento actualmente conhecido pode ser utilizado para isolar microrganismos a partir do meio de fermentação, incluindo centrifugação, filtração, ultrafiltração, decantação e evaporação de solvente. Foi verificado pelos presentes inventores que por causa de uma tão elevada densidade de biomassa resultante de processos da presente invenção, quando é utilizada uma centrífugadora para recuperar os microrganismos é preferido diluir o meio de fermentação por adição de água, que reduz a densidade da biomassa, permitindo desse modo uma separação mais eficaz dos microrganismos do meio de fermentação.

As densidades de biomassa muito elevadas conseguidas na presente invenção facilitam também processos "sem solvente" para a recuperação de lípidos microbianos. Os processos preferidos para lise das células no fermentador são descritos no Pedido Provisório de Patente U.S. com Nº de Série 60/177125 intitulado "Solventless Extraction Process" apresentado a 19 de Janeiro de 2000; O Pedido de Patente U.S. com Nº de Série 09/766500 intitulado "Solventless Extraction Process" apresentado a 19 de Janeiro de 2001 (agora Patente U.S. Nº 6750048), e Publicação de Patente PCT Nº WO-A-0153512 intitulado "Solventless Extraction

Process” apresentado a 19 de Janeiro de 2001. Os processos preferidos para recuperação dos lípidos assim que as células estão permeabilizadas, quebradas ou lisadas no fermentador (que permite a emulsão lipídica ser quebrada, e a fracção rica em lípido ser recuperada) incluem o processo de remoção de óleo delineado no documento WO 96/05278 que é aqui incorporado por referência na sua totalidade. Neste processo, um composto solúvel em água, e. g., álcool ou acetona, é adicionado à emulsão de óleo/água para quebrar a emulsão e a mistura resultante é separada através de separação gravimétrica, e. g., centrifugação. Este processo também pode ser modificado para utilizar outros agentes (água e/ou lípido solúvel) para quebrar a emulsão.

Alternativamente, os microrganismos são recuperados numa forma seca a partir do meio de fermentação por evaporação da água do meio de fermentação, *por exemplo*, por contacto directo do meio de fermentação (*i. e.*, sem pré-concentração, *por exemplo*, através de centrifugação) com um secador, tal como um dispositivo secador de tambor, *i. e.*, um processo directo de recuperação de secador de tambor. Ao utilizar o processo directo de recuperação de secador de tambor para isolar microrganismos, é utilizado tipicamente um secador de tambor aquecido a vapor. Além disso, ao utilizar o processo directo de recuperação de secador de tambor, a densidade de biomassa do meio de fermentação é, de um modo preferido, pelo menos, cerca de 130 g/L, de um modo mais preferido, pelo menos, cerca de 150 g/L, e de um modo muito preferido, pelo menos, cerca de 180 g/L. Esta densidade elevada de biomassa é geralmente desejada para o processo directo de recuperação de secador de tambor porque a uma densidade mais baixa de biomassa, o meio de fermentação compreende uma quantidade suficiente de água para arrefecer significativamente o tambor, resultando assim numa

secagem incompleta de microrganismos. Outros métodos de secar células, incluindo secagem por pulverização, são bem conhecidos do especialista na técnica.

Os processos da presente invenção proporcionam uma taxa média de produção de lípidos de, pelo menos, cerca de 0,5 g/L/h, de um modo preferido, pelo menos, cerca de 0,7 g/L/h, de um modo mais preferido, pelo menos, cerca de 0,9 g/L/h, e de um modo muito preferido, pelo menos, cerca de 1,0 g/L/h. Além disso, os lípidos produzidos por processos da presente invenção contêm lípidos polinsaturados numa quantidade maior do que cerca de 15%, de um modo preferido maior do que cerca de 20%, de um modo mais preferido maior do que cerca de 25%, ainda de um modo mais preferido maior do que cerca de 30%, e de um modo muito preferido maior do que cerca de 35%. Os lípidos podem ser recuperados quer a partir de microrganismos secos quer a partir de microrganismos no meio de fermentação. Geralmente, pelo menos, cerca de 20% dos lípidos produzidos através os microrganismos nos processos da presente invenção são ácidos gordos polinsaturados omega-3 e/ou omega-6, de um modo preferido, pelo menos, cerca de 30% dos lípidos são ácidos gordos polinsaturados omega-3 e/ou omega-6, de um modo mais preferido, pelo menos, cerca de 40% dos lípidos são ácidos gordos polinsaturados omega-3 e/ou omega-6, e de um modo muito preferido, pelo menos, cerca de 50% dos lípidos são ácidos gordos polinsaturados omega-3 e/ou omega-6. Alternativamente, os processos da presente invenção proporcionam uma taxa média de produção de ácidos gordos omega-3 (e. g., DHA) de, pelo menos, cerca de 0,2 g de ácidos gordos omega-3 (e. g., DHA)/L/h, de um modo preferido, pelo menos, cerca de 0,3 g de ácidos gordos omega-3 (e. g., DHA)/L/h, de um modo mais preferido, pelo menos, cerca de 0,4 g de ácidos gordos omega-3 (e. g., DHA)/L/h, e de um modo muito preferido, pelo menos, cerca de 0,5 g de ácidos

gordos omega-3 (e. g., DHA)/L/h. Alternativamente, os processos da presente invenção proporcionam uma taxa média de produção de ácidos gordos omega-6 (e. g., DPAn-6) de, pelo menos, cerca de 0,07 g de ácidos gordos omega-6 (e. g., DPAn-6)/L/h, de um modo preferido, pelo menos, cerca de 0,1 g de ácidos gordos omega-6 (e. g., DPAn-6)/L/h, de um modo mais preferido, pelo menos, cerca de 0,13 g de ácidos gordos omega-6 (e. g., DPAn-6)/L/h, e de um modo muito preferido, pelo menos, cerca de 0,17 g de ácidos gordos omega-6 (e. g., DPAn-6)/L/h. Ainda alternativamente, pelo menos, cerca de 25% de lípidos é DHA (com base no éster metílico total de ácidos gordos), de um modo preferido, pelo menos, cerca de 30%, de um modo mais preferido, pelo menos, cerca de 35%, e de um modo muito preferido, pelo menos, cerca de 40%.

Os microrganismos, os lípidos extraídos daí, a biomassa restante após a extracção de lípidos ou suas combinações podem ser utilizados directamente como um ingrediente alimentar, tal como um ingrediente em bebidas, molhos, lacticínios (tais como o leite, iogurte, queijo e gelado) e produtos cozinhados; suplementos nutritivos (na forma de cápsula ou comprimido); alimento ou suplemento alimentar para qualquer animal cuja carne ou produtos sejam consumidos por seres humanos; suplemento alimentar, incluindo comida para bebé e fórmulas para crianças; e produtos farmacêuticos (em aplicação directa ou terapia adjunta). O termo "animal" significa qualquer organismo pertencente ao reino Animal e inclui, sem limitação, qualquer animal a partir do qual é derivada carne de aves, pescado, carne de vaca, porco ou carneiro. O pescado é derivado de, sem limitação, peixes, camarão e marisco. O termo "produtos" inclui qualquer produto diferente de carne derivada desses animais, incluindo, sem limitação, ovos, leite ou outros produtos. Quando adicionado à dieta desses animais, os lípidos polinsaturados

podem ser incorporados na carne, leite, ovos ou outros produtos desses animais para aumentar o seu conteúdo nestes lípidos.

Os objectivos, vantagens e novas características adicionais desta invenção são ilustrados aos especialistas na técnica após examinação dos seus seguintes exemplos, que não pretendem ser limitativos.

EXEMPLOS

A estirpe *Schizochytrium* utilizada nestes exemplos produz dois ácidos polienólicos primários, DHAn-3 e DPAn-6 na proporção geralmente de cerca de 3:1, e pequenas quantidades de outros ácidos polienólicos, tais como EPA e C20:3, sob uma vasta variedade de condições de fermentação. Assim, embora os seguintes exemplos listem apenas a quantidade de DHA, a quantidade de DPA(n-6) produzida pode ser prontamente calculada através da utilização da proporção acima divulgada.

Exemplo 1 de Referência

Este exemplo ilustra o efeito do conteúdo de oxigénio num meio de fermentação sobre a produtividade de lípidos.

Os resultados da fermentação de *Schizochytrium* ATCC N° 20888 a vários níveis de conteúdo de oxigénio dissolvido foram medidos e são mostrados na Figura 1, onde RCS é a concentração residual de açúcar e DCW é o peso celular seco.

Exemplo 2 de Referência

Este exemplo também ilustra o efeito do conteúdo baixo de oxigénio no meio de fermentação sobre o conteúdo de DHA (% de peso seco) do produto final de biomassa.

Foi realizada uma experiência do tipo “pequena escala” em balões Erlenmeyer de 250 mL para mimetizar o efeito de baixo conteúdo de oxigénio sobre o conteúdo de DHA em células de *Schizochytrium* sp. cultivadas em fermentadores a grande escala. O *Schizochytrium* sp. (ATCC 20888) foi cultivado em meio O4-4. Este meio de cultura consistia no seguinte, numa base em litro dissolvido em água desionizada. Na₂SO₄ 12,61 g; MgSO₄·7H₂O 1,2 g; KCl 0,25 g; CaCl₂ 0,05 g; glutamato monossódico 7,0 g; glucose 10 g; KH₂PO₄ 0,5 g; NaHCO₃ 0,1 g; extracto de levedura 0,1 g; mistura de vitaminas 1,0 mL; metais PII 1,00 mL; A mistura de metais PII contém (por litro): 6,0 g de Na₂EDTA, 0,29 g de FeCl₃·6H₂O, 6,84 g de H₃BO₃, 0,86 g de MnCl₂·4H₂O, 0,06 g de ZnCl₂, 0,026 g de CoCl₂·6H₂O, 0,052 g de NiSO₄·H₂O, 0,002 de CuSO₄·H₂O e 0,005 g de Na₂MoO₄·2H₂O. A mistura de vitaminas contém (por litro): 100 mg de tiamina, 0,5 mg de biotina e 0,5 mg de cianocobalamina. O pH do meio de cultura foi ajustado a 7,0 e foi depois esterilizado por filtração.

A ideia por detrás desta experiência de pequena escala foi cultivar as células em balões de agitação com volumes diferentes de meio de cultura nos balões - balões quase cheios (e. g., 200 mL num balão de agitação de 250 mL) não misturariam bem numa plataforma de agitação e, deste modo, à medida que as células cresciam, seriam geradas condições de baixo oxigénio dissolvido. Deste modo, foram estabelecidos 4 tratamentos na experiência, cada um realizado em duplicado: (1) balões de 250 mL cheios com 50 mL de meio de cultura; (2) balões de 250 mL cheios com 100 mL

de meio de cultura; (3) balões de 250 mL cheios com 150 mL de meio de cultura; e (4) balões de agitação de 250 mL cheios com 200 mL de meio de cultura. Cada um dos oito balões foi inoculado com células de uma cultura com 48 horas de *Schizochytrium* cultivada em meio O4-4 sob as condições no tratamento 1, e a 28 °C e 220 rpm numa plataforma de agitação. Todos os oito balões para a experiência foram colocados numa plataforma de agitação (220 rpm) numa incubadora (28 °C) e cultivados durante 48 horas no escuro. No fim da experiência, os níveis de oxigénio dissolvido (OD) em cada balão foram medidos com um medidor de oxigénio dissolvido YSI, (YSI, Inc.), o pH do meio de cultura foi também determinado, e o peso seco das células e o seu conteúdo em ácidos gordos foi também medido. Os resultados da experiência estão delineados na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados da experiência de pequena escala que examina o efeito de baixas concentrações de oxigénio dissolvido sobre o conteúdo de ácidos gordos muito insaturados de cadeia longa (DHA, % de peso seco) de *Schizochytrium* sp.

mL de Meio	FAME (%TFA)	DHA (% de peso seco)	Biomassa (g/L)	pH Final	OD (% sat)
50	16,5	7,4	4,2	7,4	31
100	17,0	6,5	3,9	7,2	29
150	22,4	9,2	2,7	7,0	11
200	35,9	14,5	1,8	6,9	3

Os resultados indicam que o conteúdo de lípido (como % de FAME) e o conteúdo de DHA (% de peso seco) foi superior para células cultivadas a níveis baixos de oxigénio dissolvido – quanto mais baixo o nível de oxigénio dissolvido, mais elevado o

conteúdo de lípido e DHA. Este resultado é inesperado porque se acreditava, de forma geral, que era necessário oxigénio para formar ligações não saturadas (duplas). É surpreendente que se tenha formado tanto DHA a um nível baixo de oxigénio dissolvido, porque o DHA é um dos ácidos gordos mais insaturados. Embora a produção de biomassa diminua à medida que diminui o nível de oxigénio dissolvido, o conteúdo de DHA aumenta. Deste modo, é vantajoso ter uma fase de crescimento com níveis mais elevados de oxigénio dissolvido para maximizar a formação de biomassa e depois baixar o nível de oxigénio dissolvido para maximizar a produção de ácidos gordos de cadeia longa.

Exemplo 3 de Referência

Os microrganismos foram produzidos utilizando fermentadores com um volume nominal de trabalho de 1200 galões. O caldo de fermentação resultante foi concentrado e os microrganismos foram secos utilizando um secador de tambor. Os lípidos de fracções dos microrganismos resultantes foram extraídos e purificados para produzir um óleo refinado, descorado e sem odor. Foram adicionados aproximadamente 3000 ppm de acetato de d-1- α -tocoferilo para objectivos de suplemento nutritivo antes da análise do lípido.

Foram realizadas nove fermentações de *Schizochytrium* ATCC N° 20888 e os resultados são mostrados na Tabela 2. O nível de oxigénio dissolvido foi cerca de 8% durante as primeiras 24 horas e posteriormente cerca de 4%.

Tabela 2. Resultados da fermentação em descontínuo para a produção de DHA a partir de *Schizochytrium* sp.

Entrada	Idade (h)	Rendimento ¹ (g/L)	DHA ² (%)	FAME ³ (%)	Produtividade ⁴
1	100,3	160,7	17,8	49,5	0,285
2	99,8	172,4	19,4	51,3	0,335
3	84,7	148,7	14,4	41,4	0,253
4	90,2	169,5	19,7	53,9	0,370
5	99,0	164,1	12,5	38,9	0,207
6	113,0	187,1	19,7	47,2	0,326
7	97,0	153,5	13,7	41,0	0,217
8	92,8	174,8	16,4	48,6	0,309
M. ⁵	97,1	166,4	16,7	46,5	0,288
Desv.P. ⁶	8,4	12,3	2,9	5,4	0,058
CV ⁷ (%)	8,7	7,4	17,3	11,7	20,2

1. rendimento real da densidade de biomassa.

2. Conteúdo de DHA como % de peso celular seco.

3. conteúdo total de ácidos gordos como % de peso celular seco (medido como ésteres metílicos).

4. (gramas de DHA)/L/h.

5. média.

6. desvio padrão

7. coeficientes de variabilidade. Os valores de coeficientes de variabilidade abaixo de 5% indicam um processo que tem uma reprodutibilidade excelente, os valores entre 5% e 10% indicam um processo que tem uma reprodutibilidade boa e os valores entre 10% e 20% indicam um processo que têm uma reprodutibilidade razoável.

O xarope de milho foi adicionado até que o volume no fermentador alcançou cerca de 1200 galões, momento este em que foi parada a adição de xarope de milho. O processo de fermentação foi parado assim que a concentração residual de açúcar caiu abaixo de 5 g/L. A idade típica, desde a inoculação ao final, foi cerca de 100 horas.

O caldo de fermentação, *i. e.*, o meio de fermentação foi diluído com água utilizando aproximadamente uma proporção de 2:1 para reduzir o conteúdo de cinza do produto final e ajudar a melhorar a separação de fase durante o passo de centrifugação. A pasta celular concentrada foi aquecida a 160 °F (cerca de 71 °C) e seca num secador de tambor duplo Blaw Knox (42"x36"). De um modo preferido, contudo, os microrganismos são secos directamente num secador de tambor sem centrifugação prévia.

O resultado da análise de lípidos extraídos de fracções em cada entrada na Tabela 2 é sumariado na Tabela 3.

Tabela 3. Análise da biomassa microbiana produzida nas fermentações em descontínuo delineadas na Tabela 2.

Entrada	% de DHA relativamente a FAME ¹	Lípido total, % em peso
1	36,0	72,3
2	37,8	70,3
3	34,8	61,5
4	36,5	74,8
5	32,1	52,8
6	41,7	67,7

(continuação)

Entrada	% de DHA relativamente a FAME ¹	Lípido total, % em peso
7	33,4	49,9
8	33,7	61,4
Média	35,8	63,8
Desv.P. ³	3,0	9,1
CV ⁴ (%)	8,5	14,2
<p>1. ver Tabela 2.</p> <p>2. ver a discussão acima.</p> <p>3. desvio padrão.</p> <p>4. coeficientes de variabilidade. Os valores de coeficientes de variabilidade abaixo de 5% indicam um processo que tem uma reprodutibilidade excelente, os valores entre 5% e 10% indicam um processo que tem uma reprodutibilidade boa e os valores entre 10% e 20% indicam um processo que têm uma reprodutibilidade razoável.</p>		

Salvo referência em contrário, o meio de fermentação utilizado ao longo da secção de Exemplos inclui os seguintes ingredientes, em que o primeiro número indica a concentração nominal alvo e o número em parênteses indica a gama aceitável: sulfato de sódio 12 g/L (11-13); KCl 0,5 g/L (0,45-0,55); MgSO₄·7H₂O 2 g/L (1,8-2,2); antiespumante Hodag K-60 0,35 g/L (0,3-0,4); K₂SO₄ 0,65 g/L (0,60-0,70); KH₂PO₄ 1 g/L (0,9-1,1); (NH₄)₂SO₄ 1 g/L (0,95-1,1); CaCl₂·2H₂O 0,17 g/L (0,115-0,19); xarope de milho 95 DE (base de sólidos) 4,5 g/L (2-10); MnCl₂·4H₂O 3 mg (2,7-3,3); ZnSO₄·7H₂O 3 mg/mL (2,7-3,3); COCl₂·6H₂O 0,04 mg/mL (0,035-0,045); Na₂MoO₄·2H₂O 0,04 mg/mL (0-0,045); CuSO₄·5H₂O 2 mg/mL (1,8-2,2); NiSO₄·6H₂O 2 mg/mL

(1,8-2,2); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg/mL (9-11); tiamina 9,5 mg/mL (4-15); vitamina B_{12} 0,15 mg/mL (0,05-0,25) e Pantotenato de cálcio 3,2 mg/mL (1,3-5,1). Além disso, é utilizada uma solução de NH_4OH a 28% como a fonte de azoto.

O conteúdo de cinza dos microrganismos secos é cerca de 6% em peso.

Exemplo 4

Este exemplo ilustra o efeito do nível reduzido de oxigénio dissolvido no meio de fermentação na produtividade dos microrganismos na escala de 14000 galões.

Utilizando o processo descrito no Exemplo 3, foi realizada uma fermentação num volume nominal de 14000 galões utilizando uma estirpe *Schizochytrium* de tipo selvagem que pode ser obtida utilizando processos de isolamento divulgados nas Patentes U.S. N° 5340594 e 5340742 acima mencionadas. O nível de oxigénio dissolvido no meio de fermentação foi cerca de 8% durante as primeiras 24 horas, cerca de 4% a partir da 24^a hora à 40^a hora e cerca de 0,5% a partir da 40^a hora ao fim do processo de fermentação. Os resultados deste nível mais baixo de oxigénio dissolvido em processos de meio de fermentação são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4. Resultados de fermentações em descontínuo na escala de 14000 galões de *Schizochytrium* em concentrações reduzidas de oxigénio dissolvido.

Entrada	Idade (h)	Rendimento (g/L)	%DHA	%FAME	%DHA rel. a FAME	Produtividade de DHA (g de DHA/L/h)
1	82,0	179,3	21,7	52,4	41,4	0,474
2	99,0	183,1	22,3	55,0	40,5	0,412
3	72,0	159,3	–	–	40,9	–
4	77,0	161,3	–	–	43,2	–
5	100,0	173,0	23,9	53,3	44,9	0,413
6	102,0	183,3	21,6	50,8	42,6	0,388
7	104,0	185,1	23,7	55,0	43,1	0,422
8	88,0	179,3	22,3	52,6	42,4	0,454
9	100,0	166,4	22,5	53,5	42,1	0,374
10	97,0	182,6	22,8	51,6	44,1	0,429
11	87,5	176,5	19,8	45,6	43,5	0,399
12	67,0	170,8	18,8	48,1	39,1	0,479
13	97,0	184,9	23,2	52,7	44,0	0,442
14	102,0	181,9	23,6	52,9	44,6	0,421
15	102,0	186,9	19,9	47,8	41,8	0,365
16	97,0	184,4	19,6	45,5	43,0	0,373
17	98,0	174,7	19,7	45,1	43,7	0,351
18	103,5	178,8	18,3	44,5	41,2	0,316
19	102,0	173,7	15,8	43,1	36,7	0,269
20	94,0	190,4	19,3	46,9	41,1	0,391
21	72,0	172,5	22,8	52,8	43,2	0,546
22	75,0	173,1	21,0	51,7	40,8	0,485
23	75,0	152,7	20,3	50,3	40,4	0,413
24	75,5	172,5	21,9	51,7	42,3	0,500

Entrada	Idade (h)	Rendimento (g/L)	%DHA	%FAME	%DHA rel. a FAME	Produtividade de DHA (g de DHA/L/h)
25	61,0	156,4	17,3	45,7	37,8	0,444
26	74,5	150,6	20,2	50,1	40,2	0,408
27	70,5	134,3	14,8	40,6	36,6	0,282
28	75,5	146,1	21,3	49,7	42,8	0,412
29	82,0	174,3	21,4	50,4	42,5	0,455
30	105,0	182,3	21,7	50,7	42,8	0,377
31	66,0	146,2	16,4	44,6	36,7	0,363
Média	87,2	171,5	20,6	49,5	41,6	0,409
Desv.P.	13,9	14,1	2,4	3,8	2,3	0,061
CV	16,0%	8,2%	11,6%	7,7%	5,5%	15,0%

Exemplo 5

Este exemplo ilustra o efeito do nível reduzido de oxigénio dissolvido no meio de fermentação sobre a produtividade de microrganismos a uma escala de 41000 galões.

Os mesmos processos como no Exemplo 4 foram utilizados excepto que a fermentação foi realizada num fermentador de 41000 galões. Os volumes do meio de cultura foram aumentados para manter as concentrações alvo dos compostos nesta escala. Os resultados são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5. Fermentação na escala de 41000 galões de *Schizochytrium*

Entrada	Idade (h)	Rendimento (g/L)	%DHA	%FAME	%DHA rel. a FAME	Produtividade de DHA (g de DHA/L/h)
1	75,0	116,1	17,3	46,1	37,4	0,268
2	99,0	159,3	17,4	47,0	37,1	0,280
3	103,0	152,6	16,0	47,2	33,8	0,237
4	68,0	136,8	17,9	45,9	39,1	0,360
5	84,0	142,0	17,5	47,0	37,2	0,296
Média	85,8	141,4	17,2	46,6	36,9	0,288
Desv.P.	15,1	16,6	0,7	0,6	1,9	0,046
CV	17,5%	11,8	4,2%	1,3%	5,2%	15,8%

Exemplo 6

Este exemplo ilustra o efeito de azoto extra no processo de fermentação da presente invenção.

Foram realizados quatro conjuntos de experiências em descontínuo a uma escala de 250 L utilizando um processo semelhante ao Exemplo 4. Foram realizados duas experiências de controlo e duas experiências contendo amoníaco extra (1,15x e 1,25x a quantidade normal). Os resultados são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6. Efeito de amoníaco extra na fermentação de *Schizochytrium*.

Idade (h)	Rendimento (g/L)	Produtividade de Biomassa	Eficiência da Conversão	Conteúdo de DHA	Conteúdo de FAME	Produtividade de DHA
Alvo de açúcar: 7 g/L, Ponto de referência de pH básico: 5,5. Ponto de referência de pH ácido: 7,3. 1,0X NH ₃						
48	178	3,71 g/L/h	51,5%	10,7%	37,8%	0,40 g/L/h
60	185	3,08 g/L/h	46,9%	16,3%	47,2%	0,50 g/L/h
72	205	2,85 g/L/h	45,2%	17,4%	47,4%	0,50 g/L/h
84	219	2,61 g/L/h	43,8%	17,1%	45,5%	0,45 g/L/h
90	221	2,46 g/L/h	44,1%	18,4%	48,9%	0,45 g/L/h
Alvo de açúcar: 7 g/L, Ponto de referência de pH básico: 5,5. Ponto de referência de pH ácido: 7,3. 1,15X NH ₃						
48	171	3,56 g/L/h	55,6%	12,0%	36,3%	0,43 g/L/h
60	197	3,28 g/L/h	54,6%	9,4%	38,4%	0,31 g/L/h
72	191	2,65 g/L/h	52,8%	9,4%	40,0%	0,25 g/L/h
84	190	2,26 g/L/h	52,5%	10,0%	42,5%	0,23 g/L/h
90	189	2,10 g/L/h	52,2%	9,2%	43,3%	0,19 g/L/h
Alvo do açúcar: 7 g/L, Ponto de referência de pH básico: 5,5. Ponto de referência de pH ácido: 7,3. 1,25X NH ₃						
48	178	3,71 g/L/h	56,4%	11,5%	33,7%	0,43 g/L/h
60	179	2,98 g/L/h	48,6%	10,3%	36,0%	0,31 g/L/h
72	180	2,50 g/L/h	48,8%	12,0%	37,6%	0,30 g/L/h
84	181	2,15 g/L/h	46,1%	13,6%	40,1%	0,29 g/L/h
90	185	2,06 g/L/h	45,7%	12,6%	40,7%	0,26 g/L/h
Alvo do açúcar: 7 g/L, Ponto de referência de pH básico: 5,5. Ponto de referência de pH ácido: 7,3. 1,0X NH ₃						
48	158	3,29 g/L/h	55,7%	13,1%	36,5%	0,43 g/L/h
60	174	2,90 g/L/h	48,9%	17,9%	39,2%	0,52g/L/h
72	189	2,63 g/L/h	45,7%	21,0%	39,4%	0,55 g/L/h
84	196	2,33 g/L/h	44,1%	22,4%	40,1%	0,52 g/L/h
90	206	2,29 g/L/h	44,8%	22,1%	40,3%	0,51 g/L/h

Em geral, o azoto extra tem um efeito negativo no desempenho da fermentação, uma vez que foram observadas reduções

significativas na produtividade de DHA para os dois lotes onde foi adicionado amoníaco extra. Como mostrado na Tabela 6, os lotes de controlo resultaram em níveis finais de DHA de 18,4% e 22,1% de peso celular seco total versus 9,2% (1,15x de amoníaco) e 12,6% (1,25x de amoníaco) para lotes suplementados com azoto extra.

Exemplo 7

Este exemplo mostra um perfil cinético de um processo de fermentação da presente invenção.

Foi realizada uma experiência em descontínuo a uma escala de 1000 galões utilizando um processo semelhante ao Exemplo 4. O perfil cinético do processo de fermentação é mostrado na Tabela 7.

Tabela 7. Perfil cinético para uma fermentação em descontínuo de uma escala de 1000 galões de *Schizochytrium*.

Idade (h)	Rendimento (g/L)	Produtividade de Biomassa	Eficiência da Conversão	Conteúdo de DHA %	Conteúdo de FAME %	Produtividade de DHA
24	118	4,92 g/L/h	78,2%	7,4	18,8	0,36 g/L/h
30	138	4,60 g/L/h	60,3%	10,6	30,9	0,49 g/L/h
36	138	3,83 g/L/h	46,6%	11,6	36,5	0,44 g/L/h
42	175	4,17 g/L/h	49,8%	13,4	41,7	0,56 g/L/h
48	178	3,71 g/L/h	45,1%	18,7	52,8	0,69 g/L/h
48*	164	3,42 g/L/h	41,5%	15,3	33,1	0,52 g/L/h
54	196	3,63 g/L/h	45,7%	16,6	51,2	0,60 g/L/h
60	190	3,17 g/L/h	41,7%	16,9	33,9	0,54 g/L/h
72	189	2,62 g/L/h	39,1%	15,6	31,8	0,41 g/L/h
84	195	2,32 g/L/h	38,5%	16,4	32,7	0,38 g/L/h

(continuação)

Idade (h)	Rendimento (g/L)	Produtividade de Biomassa	Eficiência da Conversão	Conteúdo de DHA %	Conteúdo de FAME %	Produtividade de DHA
90	200	2,22 g/L/h	39,0%	18,8	33,3	0,42 g/L/h
90	171	1,90 g/L/h	33,3%	22,2	61,6	0,42 g/L/h**
<p>* Foram analisadas duas amostras separadas às 48 horas.</p> <p>** Isto é para uma amostra lavada de pesos celulares secos (DCW). Outros valores descritos são para amostras não lavadas.</p>						

Exemplo 8

Este exemplo ilustra o efeito da quantidade da fonte de carbono sobre a produtividade.

Foram realizados três processos de fermentação diferentes que utilizam o processo de Exemplo 4, utilizando várias quantidades da fonte de carbono. Os resultados são mostrados na Tabela 8.

Tabela 8. O fermentação resulta para várias quantidades de fonte de carbono na fermentação de *Schizochytrium*.

Idade (h)	Rendimento (g/L)	Carga de Carbono	Eficiência da Conversão	Conteúdo de DHA %	Conteúdo de FAME %	Produtividade (g/L/h)
90	171	51,3%	33,3%	22,2	61,6	0,42
94	122	40,5%	30,1%	19,1	57,3	0,25
59	73	20,0%	36,5%	11,9	40,8	0,15

Exemplo 9 de Referência

Este exemplo ilustra o efeito da limitação de nutriente na eficiência da conversão de carbono em biomassa, lípido e muito especificamente DHA.

Foi realizada uma experiência de cultura contínua para investigar o efeito da limitação de nutriente através do cultivo de *Schizochytrium* ATCC N° 20888 num fermentador Applikon de volume 2 litros em meio de cultura basal (ICM-2) consistindo dos seguintes compostos (concentração nominal): ingredientes do Grupo I: Na_2SO_4 (18,54 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2,0 g/L) e KCl (0,572 g/L); ingredientes do Grupo II (cada um preparado separadamente): glucose (43,81 g/L), KH_2PO_4 (1,28 g/L), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,025 g/L) e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (6,538 g/L); Ingredientes do Grupo III: Na_2EDTA (6,0 mg/L), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,29 mg/L), H_3BO_3 (6,84 mg/L), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,86 mg/L), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,237 mg/L), $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,026 mg/L), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,005 mg/L), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,002 mg/L) e $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,052 mg/L); e ingredientes de Grupo IV: tiamina HCl (0,2 mg/L), Vitamina B_{12} (0,005 mg/L), pantotenato de cálcio (0,2 mg/L). Os grupos I e II foram esterilizados por autoclave, enquanto os Grupos III e IV foram esterilizados por filtração antes de serem adicionados ao fermentador. O meio de cultura foi depois inoculado com *Schizochytrium* e cultivado sob condições controladas de 30 °C, pH 5,5 e oxigênio dissolvido de 20% de saturação até ser atingida uma densidade celular máxima.

Foi depois estabelecido um modo de operação contínuo através do bombeamento simultâneo de meio de alimentação estéril ICM-2 no fermentador e remoção do caldo contendo células *Schizochytrium*, a um caudal suficiente para manter uma taxa de diluição de $0,06 \text{ h}^{-1}$ até ser atingido um estado estacionário. Para investigar o efeito da limitação de nutriente, o composto

contendo o nutriente requerido especificado é diminuído no meio de alimentação ICM-2, de modo que este nutriente seja esgotado no caldo contendo células de saída, de modo que o crescimento das células esteja limitado pela ausência do nutriente requerido particular. Uma vez estabelecida a operação de estado estacionário para cada condição, foram medidas a biomassa seca do caldo final, glucose residual, e concentrações de nutrientes limitantes, conteúdo de lípidos da célula e conteúdo de DHA das células. A eficiência da conversão de glucose em biomassa foi calculada dividindo a glucose total consumida pela biomassa seca total formada, e expressa numa base percentual.

Os efeitos de limitação do crescimento por cada nutriente individual foram estudados através da repetição desta experiência para cada nutriente individual listado na seguinte tabela. Os resultados finais são sumariados na seguinte tabela:

Tabela 9. Efeito da limitação de nutriente sobre o rendimento de biomassa, eficiência de conversão (glucose → biomassa), conteúdo de lípidos e conteúdo de DHA de *Schizochytrium* sp.

Nutriente Limitante	Biomassa ¹ (g/L)	$Y_{x/s}$ ²	RCS ³ (g/L)	Conteúdo de lípidos ⁴ (%)	Conteúdo de DHA ⁵ (%)
Glucose	18,7	46,8	0,0	19,8	7,3
Azoto	14,5	36,3	0,6	47,5	10,3
Fosfato	17,8	44,5	0,8	37,0	8,2
Tiamina	7,5	18,8	7,7	11,1	4,0
Zinco	16,0	40,0	1,3	27,8	7,2
Cobre	14,0	35,0	10,4	13,8	5,3
Cobalto	14,5	36,3	0,0	22,2	6,9
Níquel	17,8	44,5	0,0	21,9	8,0
Ferro	15,9	39,8	3,5	18,5	7,2

(continuação)

Nutriente Limitante	Biomassa ¹ (g/L)	$Y_{x/s}$ ²	RCS ³ (g/L)	Conteúdo de lípidos ⁴ (%)	Conteúdo de DHA ⁵ (%)
Manganês	12,5	31,3	3,4	26,1	8,0
Magnésio	13,9	34,8	5,3	18,7	6,4
Cálcio	16,7	41,8	4,3	18,7	6,4
Vitamina B12	19,6	49,0	0,0	17,5	6,3
Molibdénio	18,9	47,3	0,0	19,3	7,0
Pantotenato	19,2	48,0	0,0	20,4	6,7
Sódio	17,9	44,8	1,8	21,8	8,2
Potássio	13,0	32,5	8,8	14,1	5,3
1. concentração de biomassa seca (gramas/litro) 2. coeficiente de rendimento (% de biomassa produzida/glucose consumida) 3. concentração de glucose residual no caldo (gramas/litro) 4. conteúdo de lípidos da biomassa seca (g de lípido (como FAME)/g de biomassa seca) 5. Conteúdo de DHA de biomassa seca (g de DHA/g de biomassa seca)					

É claro a partir da tabela que a limitação de azoto resultou na mais elevada acumulação de DHA nas células, seguida por fosfato, sódio, níquel, manganês, glucose (carbono), zinco e ferro. Esta informação pode ser utilizada comercialmente através da alimentação de um ou mais destes nutrientes numa fermentação em descontínuo a uma taxa suficiente para limitar o crescimento celular. No caso muito preferido, o azoto é alimentado de um modo limitante na fermentação em descontínuo para maximizar o conteúdo de DHA das células. Os outros nutrientes (ou suas misturas) podem ser alimentados de um modo limitante para maximizar a produção de biomassa ou de outros produtos valiosos. Outros elementos ou nutrientes biologicamente requeridos que não foram avaliados, tal como o enxofre, poderiam também ser utilizados como nutrientes limitantes nesta estratégia de controlo de fermentação.

Lisboa, 25 de Outubro de 2007

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a produção os lípidos microbianos compreendendo:

(a) realização de uma fermentação de um meio compreendendo microrganismos, uma fonte de carbono e uma fonte de nutriente limitante e proporcionar condições suficientes para manter um nível de oxigénio dissolvido de, pelo menos, cerca de 4% de saturação no referido meio de fermentação para aumentar a densidade da biomassa;

(b) proporcionar subsequentemente, condições suficientes para manter um nível de oxigénio dissolvido de cerca de 1% ou menos, de saturação no referido meio de fermentação e proporcionar condições suficientes para permitir aos referidos microrganismos produzirem os referidos lípidos; e

(c) recuperar os referidos lípidos microbianos,

em que, pelo menos, cerca de 15% dos referidos lípidos microbianos são lípidos polinsaturados; e

em que é conseguida uma densidade de biomassa de, pelo menos, 100 g/L durante a fermentação.

2. Processo para enriquecer o conteúdo de ácidos gordos polienólicos de um microrganismo compreendendo a fermentação do referido microrganismo num meio de cultura que tem um nível de oxigénio dissolvido de menos de 1% de saturação.

3. Processo da Reivindicação 1 ou 2, em que o referido meio de fermentação ou meio de cultura está a uma temperatura de, pelo menos, cerca de 20 °C.
4. Processo da Reivindicação 1 ou 2, em que o referido processo produz lípidos a uma taxa média de, pelo menos, cerca de 0,5 g/L/h.
5. Processo da Reivindicação 1 ou 2, em que o referido processo produz lípidos a uma taxa média de, pelo menos, cerca de 0,5 g/L/h e em que, pelo menos, cerca de 15% dos referidos lípidos são lípidos polinsaturados.
6. Processo da Reivindicação 1 ou 2, em que o referido processo produz lípidos a uma taxa média de, pelo menos, cerca de 0,5 g/L/h e em que a quantidade total de ácidos gordos omega-3 e omega-6 é, pelo menos, cerca de 20% dos referidos lípidos.
7. Processo da Reivindicação 1 ou 2, em que o referido processo produz lípidos a uma taxa média de, pelo menos, cerca de 0,5 g/L/h e em que, pelo menos, cerca de 25% dos referidos lípidos é ácido docosa-hexaenóico.
8. Processo da Reivindicação 1 ou 2, em que os referidos microrganismos são seleccionados do grupo consistindo em algas, fungos (incluindo levedura), protistas, bactérias e suas misturas, em que os referidos microrganismos são capazes de produzir ácidos gordos polienólicos.
9. Processo da Reivindicação 1 ou 2, em que os referidos microrganismos são seleccionados do grupo consistindo em algas, fungos (incluindo levedura), protistas, bactérias e suas misturas, em que os referidos microrganismos são

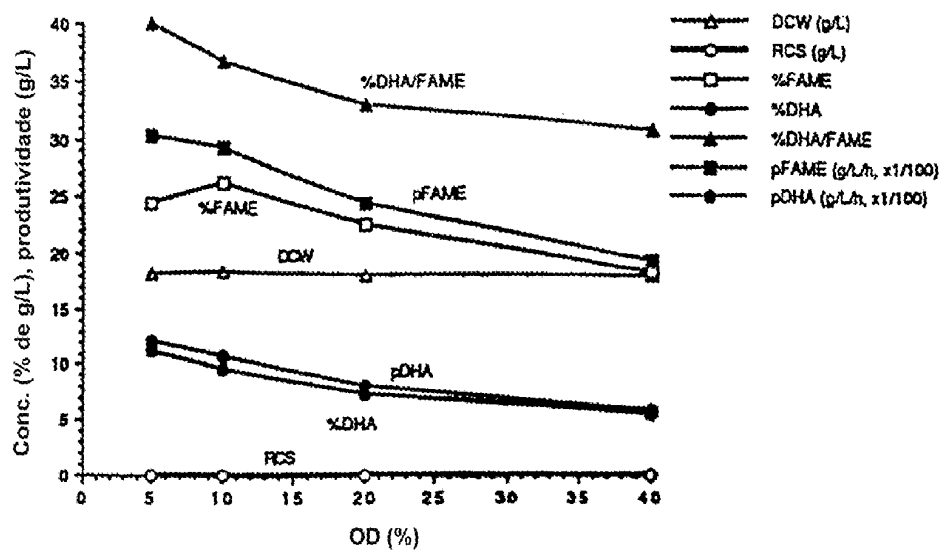
capazes de produzir ácidos gordos polienólicos e em que os referidos microrganismos são cultivados num processo em descontínuo.

10. Processo da Reivindicação 1 ou 2, em que os referidos microrganismos são seleccionados do grupo consistindo em algas, fungos (incluindo levedura), protistas, bactérias e suas misturas, em que os referidos microrganismos são capazes de produzir ácidos gordos polienólicos e em que os referidos microrganismos são cultivados num processo em descontínuo e compreendendo ainda a manutenção de um nível de oxigénio menor do que cerca de 3% de saturação no referido meio de fermentação durante o passo (a).
11. Processo da Reivindicação 1 ou 2, em que os referidos microrganismos são microalgas e microrganismos de tipo algas.
12. Processo da Reivindicação 1 ou 2, em que os referidos microrganismos são *Stramenopiles*.
13. Processo da Reivindicação 1 ou 2, em que os referidos microrganismos são da ordem *Thraustochytriales*.
14. Processo da Reivindicação 1 ou 2, em que os referidos microrganismos são seleccionados do grupo consistindo em *Thraustochytrium*, *Schizochytrium*, e suas misturas.
15. Processo da Reivindicação 1, em que a referida fonte de carbono é uma fonte de carbono não alcoólica.

16. Processo da Reivindicação 1 ou 2, em que o referido processo produz em média, pelo menos, cerca de 0,2 g/L/h de ácido docosa-hexaenóico.
17. Processo da Reivindicação 1, em que o referido passo de recuperação de lípidos compreende:
- (d) remoção da água do referido meio de fermentação para proporcionar microrganismos secos; e
 - (e) isolamento dos referidos lípidos a partir dos microrganismos secos.
18. Processo da Reivindicação 1, em que o referido passo de recuperação de lípidos compreende:
- (d) evaporação da água do referido meio de fermentação sem centrifugação prévia para proporcionar microrganismos secos; e
 - (e) isolamento dos referidos lípidos a partir dos microrganismos secos.
19. Processo da Reivindicação 1, em que o referido passo de recuperação de lípidos compreende:
- (d) o tratamento do caldo de fermentação para permeabilizar, lisar ou quebrar as células microbianas; e
 - (e) a recuperação dos lípidos do caldo de fermentação através de separação gravimétrica, com ou sem a ajuda de um agente para ajudar a quebrar a emulsão lípido/água.

20. Processo da Reivindicação 2, em que durante uma fase inicial do crescimento, o nível de oxigénio dissolvido é maior do que cerca de 10% de saturação e durante uma fase subsequente de produção, o nível de oxigénio dissolvido é menor de 1% de saturação.
21. Processo da Reivindicação 2, em que o referido microrganismo contém genes da policétido sintase.
22. Processo heterotrófico para a produção de produtos e microrganismos compreendendo o cultivo dos referidos microrganismos num meio de cultura que tem um nível de oxigénio dissolvido menor do que cerca de 1% de saturação, em que os referidos microrganismos contêm genes da policétido sintase.
23. Processo da reivindicação 22, em que os referidos genes da policétido sintase ocorrem naturalmente nos referidos microrganismos.
24. Processo da reivindicação 22, em que os referidos genes da policétido sintase são introduzidos geneticamente nos referidos microrganismos.
25. Processo da reivindicação 22, em que durante uma fase inicial do crescimento, o nível de oxigénio dissolvido é maior do que cerca de 10% de saturação e durante uma fase subsequente da produção, o nível de oxigénio dissolvido é menor do que cerca de 1%.

Lisboa, 25 de Outubro de 2007



O efeito do OD sobre DHA/FAME

OD (%)	RCS (g/L)	DCW (g/L)	FAME (g/L)	DHA (g/L)	FAME (%)	DHA (%)	DHA/FAME (%)	pFAME (g/L/h)	pDHA (g/L/h)
5	0.0	18.1	5.0	2.0	24.4	11.3	46.6	0.302	0.121
10	0.0	18.3	4.9	1.8	26.3	9.6	36.7	0.292	0.107
20	0.0	18.0	4.1	1.3	22.6	7.4	33.0	0.244	0.080
40	0.0	17.8	3.2	1.0	18.2	5.6	30.6	0.191	0.059

Figura I