

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 825 062**

51 Int. Cl.:

C12N 1/12 (2006.01)

C12P 7/64 (2006.01)

A23K 20/158 (2006.01)

A23L 33/12 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.11.2013** **PCT/NZ2013/000213**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.02.2015** **WO15016720**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2013** **E 13890442 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2020** **EP 3027732**

54 Título: **Métodos para la producción de biomasa de diatomeas**

30 Prioridad:

01.08.2013 NZ 61359313

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

14.05.2021

73 Titular/es:

FERMENTALG (100.0%)

4 rue Rivière

33500 Libourne, FR

72 Inventor/es:

DINES, MARK HUMPHREY;

GRIFFITHS, HYWEL DAVID y

GIBBS, MORELAND DAVID

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 825 062 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 para la producción de biomasa de diatomeas

Campo de la invención

5 La invención se refiere a métodos de producción de biomasa de diatomeas. Más particularmente, la invención se refiere a métodos para producir una biomasa de diatomeas utilizando un cultivo continuo. En una realización preferida, la biomasa comprende ácidos grasos altamente insaturados.

Antecedentes de la invención

10 Las diatomeas son un grupo generalizado de microalgas que se pueden encontrar en los océanos, el agua dulce y en los suelos. La biomasa procedente del cultivo de diatomeas (ya sea producida natural o comercialmente) contiene una serie de productos de interés comercial, incluidos los lípidos, ácidos grasos (particularmente ácidos grasos altamente insaturados — HUFA), aminoácidos, pigmentos y productos naturales complejos de interés farmacológico. La biomasa en sí también tiene aplicaciones dietéticas (particularmente en la acuicultura), y el tratamiento del agua contaminada por fósforo y nitrógeno en la acuicultura efluente, o metales pesados (biorremediación). Otra aplicación en desarrollo es el uso de silicio derivado de frústulas (la pared celular o capa externa de las diatomeas) en nanotecnología. Sin embargo, la relevancia comercial de los productos derivados de las diatomeas dependerá del coste de su producción.

La fermentación industrial es un proceso costoso en términos de equipamientos capitales, nutrientes y energía, y generalmente sólo se justifica cuando se produce un producto de valor relativamente alto en grandes cantidades.

20 Son posibles diferentes modos de cultivo o fermentación. El modo de fermentación más simple y el que se utiliza casi exclusivamente en los procesos industriales es la fermentación por lotes. En la fermentación por lotes, las células se inoculan en medio nutritivo, se cultivan durante un período de tiempo y luego se recuperan. La fermentación por lotes de alimentación es similar a la de lotes en general, pero difiere en que los nutrientes concentrados se suministran al cultivo durante el período de crecimiento. La fermentación continua implica una recuperación del producto continua del cultivo que comprende biomasa y una solución de nutrientes del recipiente de fermentación y su sustitución por una solución nutritiva recién preparado. La tasa de recuperación del producto en la fermentación continua se elige para que la densidad de las células en cultivo se mantenga constante. La fermentación semicontinua es similar a la fermentación continua, excepto que las recuperaciones del producto son periódicas en lugar de continuas. La fermentación por perfusión implica una recuperación del producto continua de un medio de cultivo que contiene el producto de interés, mientras que las células que producen el producto son retenidas en el cultivo.

35 Cuando el producto de interés se produce dentro de las células, las células se cultivan generalmente a las densidades de biomasa más altas posibles para obtener la productividad volumétrica más eficiente (es decir, la cantidad de producto producido por volumen de medio de fermentación por unidad de tiempo), minimizando así el coste de producción del producto de interés. Sin embargo, a altas densidades de biomasa puede haber dificultades para proporcionar suficiente oxígeno, nutrientes y, en su caso, luz. Por ejemplo, en una fermentación por lotes de alimentación o simplemente por lotes, los cultivos microbianos se encuentran generalmente en una fase estacionaria en el momento de la recuperación del producto. Es habitual que el medio o el régimen de alimentación en este tipo de fermentaciones resulte en que el cultivo esté altamente limitado para uno o más nutrientes, a menudo como un medio para inducir la formación de metabolitos secundarios (que a menudo son productos de interés comercial).

40 Anteriormente se sabía que los organismos fotosintéticos (por ejemplo, las microalgas) se pueden cultivar fototróficamente en condiciones de cultivo continuo o semicontinuo. En estas condiciones, la luz se utiliza como fuente de energía, en lugar de reducir el carbono. Muchos autores (por ejemplo, Richardson et al. (1969) Applied Microbiology 18:245-250; Droop (1974) J. Mar. Biol. Ass. U.K. 54:825-855; Laing (1991) Lab. Leaflet MAFF Direct. Fish. Res., Lowestoft, (67) 31pp) han descrito medios para cultivar algas en cultivos fototróficos continuos o semicontados (turbidostatos). En tales cultivos, las células están generalmente limitadas por la cantidad de luz disponible y, por lo tanto, las densidades de cultivo son bajas dando lugar a una productividad volumétrica muy baja. Los avances en la tecnología de los fotobiorreactores han superado el problema de la limitación de la luz hasta cierto punto al estrechar el plano óptico y permitir que los cultivos alcancen concentraciones de biomasa más altas (Zou et al. (2000) Eur. J. Phycol. 35:127-133). Sin embargo, esto requiere un aumento en la relación superficie-volumen del cultivo y aumenta significativamente la estructura de costes de capital de los reactores. Además, en estas concentraciones el crecimiento es lento (ligeramente limitado) y, por lo tanto, la productividad volumétrica es de nuevo baja. Estos sistemas de fotobiorreactores también tienen la desventaja de que es poco económico construirlos para volúmenes lo suficientemente grandes como para abastecer la demanda industrial e, incluso, los mejores diseños de fotobiorreactores comercialmente escalables todavía producen densidades de biomasa en sólo 55 alrededor de una décima parte de la que es capaz en un fermentador. Estos fotobiorreactores son por lo tanto generalmente considerados como sólo una herramienta de laboratorio para el estudio del crecimiento de organismos fotosintéticos.

Los productos farmacéuticos, alimentos médicos y suplementos nutricionales que contienen ácidos grasos altamente insaturados (HUFA) se utilizan actualmente para tratar a cientos de miles y, potencialmente, pronto se utilizarán para tratar a millones de pacientes. El ácido eicosapentaenoico (EPA) es un HUFA utilizado como un metabolito activo en sustancias farmacológicas. El ácido docosahexaenoico (DHA) también tiene un gran potencial para su uso en la industria farmacéutica, alimentos médicos y suplementos nutricionales. Un ejemplo de su uso es el propio tratamiento o el tratamiento profiláctico de la enfermedad cardiovascular.

Los HUFA no pueden sintetizarse químicamente de novo económicamente, por lo que deben extraerse de una fuente biológica. Los fabricantes farmacéuticos actualmente confían en el pescado como fuente de HUFA para la producción de sustancias farmacológicas. La dependencia exclusiva del aceite de pescado para tales fines, sin embargo, conlleva una serie de riesgos graves para los fabricantes de productos farmacéuticos y compañías farmacéuticas, así como potencialmente para los pacientes que reciben tales medicamentos. Tales riesgos incluyen, entre otros, aquellos asociados con la escasez de un suministro potencial, lo que puede ser devastador financieramente para las compañías farmacéuticas, y puede afectar negativamente a los pacientes que dependen de medicamentos para su bienestar. El aceite de pescado en sí no es un material de referencia específico ya que su composición difiere drásticamente entre diferentes especies de peces. Incluso dentro de una sola especie de pez la composición varía de un lugar a otro e incluso varía en diferentes épocas del año en un solo lugar. Tal variabilidad en el material de partida hace que la fabricación de un producto farmacéutico final sea muy difícil. Además, existe una creciente preocupación por los contaminantes tóxicos, como los poli(bifenilos clorados) (PCB), la dioxina y el metilmercurio que aparecen en los aceites de pescado. También hay preocupaciones generalizadas sobre la sostenibilidad a largo plazo de las poblaciones de peces silvestres y la acuicultura.

Por lo tanto, existe una necesidad precisa de fuentes alternativas de HUFA al aceite de pescado que sean coherentes, fiables y, por lo tanto, adaptativas a los métodos de producción comerciales y sostenibles. La fermentación industrial es una alternativa posible para la producción comercial de HUFA. Sin embargo, hay una serie de problemas asociados al uso de la fermentación industrial a escala comercial.

Varios autores han descrito el cultivo continuo de microorganismos para la producción de lípidos (por ejemplo, Hall y Ratledge (1977) *App. Env. Microbiol.* 33:577-584; Gill et al. (1977) *App. Env. Microbiol.* 33:231-239; Ykema et al. (1988) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29:211-218; Brown et al. (1989) *J. Ferm. Bioeng.* 68:344-352; Kendrick & Ratledge (1992) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37:18-22; Papanikolaou & Aggelis (2002) *Bioresource Technology* 82:43-49). Mientras que algunos de estos describen una alta productividad volumétrica de biomasa, ninguno de los organismos descritos produce ácidos grasos altamente insaturados (HUFA; ácidos grasos con 20 o más carbonos y 4 o más enlaces dobles).

Otros tipos de organismos, en particular las microalgas del género *Cryptocodinium* y los hongos marinos de la familia *Thraustochytriales* (incluyendo las especies de *Schizochytrium*, las especies de *Thraustochytrium* y las especies de *Ulkenia*) pueden ser más adecuados para la producción de HUFA y, particularmente, el DHA del OMEGA-3. Si bien estos organismos producen las mayores cantidades de DHA en condiciones limitantes de nitrógeno y, por lo tanto, son adecuados para los cultivos por lotes alimentados utilizados en los procesos industriales, algunos autores han descrito cultivos heterotróficos continuos de estas especies para la producción de DHA. Sin embargo, la mayoría de estos cultivos continuos sólo se demostraron en el laboratorio y tenían bajas tasas de producción, las cuales no son comercialmente viables.

Ganuza e Izquierdo ((2007) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76:985-990) describen un cultivo continuo de *Schizochytrium* G13/2S para la producción de DHA. Su productividad máxima de biomasa se produjo a una dilución de 0,04 por hora y un peso en seco de 7,7 g/L proporcionando una productividad volumétrica de sólo 7,4 g/L/día.

Ethier et al. ((2011) *Bioresource Technology* 102:88-93) describen un cultivo continuo de *Schizochytrium limacinum* para producir DHA. Su mayor productividad de biomasa fue de sólo 3,88 g/L/día.

Pleisner y Errikson (<http://www.marbio.sdu.dk/uploads/MarBioShell/Pleissner%20-%20VejleNuthetalPoster.pdf>, recuperado el 8 de febrero de 2013), describe un cultivo continuo de *Cryptocodinium cohnii* para producir DHA, pero sólo logra una productividad de biomasa de 12 g/L/día. Además, a esta productividad volumétrica, el contenido de HUFA de la biomasa era de sólo el 1,67%, lo que hacía que la extracción final y el procesamiento fueran problemáticos.

Por el contrario, Wumpelmann en el documento WO2005/021735 describe un cultivo continuo de *Schizochytrium limnaceum* para la producción de DHA a altas densidades de cultivo y a través de esto logra productividades de biomasa superiores a 100 g/L/día. El autor describe métodos que son particularmente adecuados para producir DHA a partir de este organismo, indicando, por ejemplo, que la tensión de oxígeno disuelto debe mantenerse a niveles bajos, pero no proporciona una orientación suficiente sobre si tales condiciones pueden utilizarse incluso para otros tipos de microorganismos o, en caso afirmativo, cómo deben variarse esas condiciones para permitir este tipo de productividades para otros organismos con requisitos ambientales y nutricionales completamente diferentes. Los métodos descritos por el autor tampoco son adecuados para la producción a una escala industrialmente relevante. De hecho, los ejemplos descritos sólo se llevan a cabo en fermentadores de 2 L en el laboratorio y el coste de

utilizar sólo uno de los componentes de los medios constituyentes (por ejemplo, ácidos casamino) como fuente de nitrógeno sería prohibitivamente caro a escalas de 100 L o más.

Otros tipos de organismos, en particular las diatomeas, pueden ser más adecuados para la producción de la EPA de omega-3, especialmente cuando es ventajoso que la EPA se produzca con cantidades relativamente bajas de DHA presentes.

Wen y Chen describen el cultivo heterotrófico de la diatomea *Nitzschia laevis* para la producción de EPA del ácido graso omega-3. Sin embargo, en cultivos continuos verdaderos su productividad máxima de biomasa fue de sólo 2,8 g/L/día ((2002) Biotechnol. Prog. 18:21-28), mientras que con la adición de perfusión (donde las células y los medios se separan, las células se devuelven al fermentador y se añaden otros medios recién preparados), esto se elevó a 6,75 g/L/día ((2001) Appl Microbiol Biotechnol 57:316-322).

Griffiths et al. (documento WO2011/155852) describieron el cultivo heterotrófico de la diatomea *Nitzschia laevis* tanto en un cultivo continuo asistido por perfusión como en un cultivo continuo real. Mientras que los autores no describen las productividades volumétricas de los cultivos, los pesos en seco del cultivo fueron de alrededor de 10 g/L o menos y en cultivos continuos asistidos por perfusión el volumen total eliminado del cultivo fue un volumen de fermentador al día. Incluso si todo este volumen era recuperado y ninguno se sometía a perfusión, la productividad máxima de biomasa era significativamente mayor de la descrita por Wen y Chen, aunque todavía se encontraba en alrededor de 10 g/L/día.

Compendio de la invención

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona un método para producir una biomasa de diatomeas a una tasa de producción volumétrica de biomasa de al menos 20 g de peso seco/L/día, en el que la diatomea produce al menos un ácido graso altamente insaturado (HUFA), comprendiendo el método los pasos de cultivar de forma heterotrófica y continua en un medio de cultivo y eliminar al menos el 50% del volumen total del cultivo cada 24 horas y su sustitución por medio recién preparado, donde el medio de cultivo está diseñado para proporcionar los nutrientes esenciales y mantener la diatomea bajo un crecimiento en fase logarítmica y en el que se añade continuamente una fuente de silicato durante el curso del cultivo.

Preferiblemente se selecciona al menos un ácido graso altamente insaturado (HUFA) de uno cualquiera o más de uno de EPA, DHA y ARA.

En particular, la biomasa de diatomeas contiene una mezcla de EPA y DHA a un nivel de al menos 2% peso celular en seco de la biomasa.

En particular, la biomasa de diatomeas contiene EPA a un nivel de al menos el 2% del peso celular en seco de la biomasa.

Preferiblemente, la diatomea se selecciona de cualquiera de una especie de *Nitzschia*, una especie de *Cyclotella*, una especie de *Phaeodactylum*.

Preferiblemente, el método incluye la sustitución de al menos el 10% del volumen de cultivo por medio recién preparado cada 4 horas.

Preferiblemente, el método incluye la sustitución de al menos el 5% del volumen de cultivo por medio recién preparado cada 2 horas.

Preferiblemente, el método incluye la sustitución de al menos 0,2% del volumen de cultivo con medio recién preparado cada 5 min.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona un método para producir una composición de un ácido graso altamente insaturado (HUFA) o un éster del mismo, incluyendo el método el paso de extraer el HUFA o su éster de la biomasa producida por los métodos de la invención según se describe en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

Se describirán a continuación las realizaciones de la invención, a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos que las acompañan en los que:

La Figura 1 muestra la cantidad de biomasa recuperada en gramos por día por litro de un cultivo continuo de la invención.

La Figura 2 muestra los pesos en seco de cultivos a lo largo del tiempo para cultivos con diferentes provisiones de azufre.

La Figura 3 muestra el gráfico de pesos en seco de cultivo logrados frente a la provisión de azufre.

La Figura 4 muestra un gráfico del peso de las células en seco en el que los cultivos divergieron del crecimiento en fase logarítmica frente al suministro de azufre.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

5 En términos generales, la invención se refiere a métodos de cultivo de una diatomea para producir biomasa de diatomeas a tasas de producción comercialmente útiles.

La biomasa de diatomeas contiene una serie de productos de interés comercial, incluyendo lípidos, ácidos grasos, aminoácidos, pigmentos y productos naturales complejos de interés farmacológico. La biomasa en sí también tiene uso comercial.

10 La producción de ácidos grasos altamente insaturados (HUFA) es de particular interés, particularmente la producción del ácido eicosapentaenoico HUFA (EPA). Se ha encontrado que las diatomeas pueden ser inducidas para producir EPA en ausencia de altos niveles de compuestos conjuntamente concentrantes como el DHA, lo que permite la producción de EPA, que es capaz de ser concentrado y purificado.

15 Anteriormente se pensaba que la producción de biomasa por microbios sólo podía ser económica si los microbios se cultivaban en lotes o se alimentaban en condiciones de fermentación por lotes donde se alcanzaba la densidad máxima de biomasa microbiana. En particular, también se creía que algunas clases de microbios, como las diatomeas, ni siquiera podían utilizarse para la producción económica de biomasa en condiciones de fermentación por lotes o condiciones de fermentación de lotes alimentados porque los cultivos sufrían de un crecimiento lento y/o tenían una proporción relativamente baja de su biomasa como producto comercial deseado, o sus necesidades nutricionales únicas hacían que fueran muy difíciles de cultivar. Las diatomeas tienen necesidades ambientales y
20 nutricionales particulares e inusuales, incluyendo un requerimiento de grandes cantidades de sílice (un elemento estructural de sus paredes celulares) y, en su mayor parte, un requerimiento de un medio de crecimiento salino. Mientras que estos microbios fermentativos pueden ser cultivados en modo de lote alimentado en fermentadores clásicos en el laboratorio, las características de los organismos dan lugar a una productividad volumétrica tan baja que el coste de la fermentación a escala industrial se convierte en prohibitivo.

25 Las fases del crecimiento microbiano se clasifican ampliamente como fase inicial (donde los microbios se están adaptando a las condiciones de crecimiento), fase logarítmica (también conocida como fase logarítmica o fase exponencial, donde los microbios se multiplican a una tasa exponencial), fase estacionaria (cuando se alcanza la densidad celular máxima según se igualan la tasa de crecimiento y la tasa de mortalidad; esto es debido a menudo a un factor limitante del crecimiento como la eliminación de nutrientes) y la fase de mortalidad (cuando la tasa de mortalidad es mayor que la tasa de crecimiento).
30

Sorprendentemente, los inventores han encontrado posible lograr productividades volumétricas lo suficientemente altas como para ser económicas a través del uso del cultivo continuo de las diatomeas. Al mantener el cultivo en un crecimiento en fase logarítmica, o cerca de ésta, estas diatomeas pueden tener una menor densidad de biomasa y / o contenido de las moléculas deseadas en el momento de recuperar el producto en comparación con los cultivos en fase estacionaria convencionales producidos por la fermentación por lotes y por lotes alimentados, pero se encontró que la productividad general del cultivo era mucho mayor de lo que se podía lograr en un cultivo por lotes o por lotes alimentados. Además, la productividad del HUFA deseado era más alta. Típicamente, la transferencia a la fase estacionaria de un cultivo da como resultado la inducción de la producción de grandes cantidades de productos comercialmente útiles y la transferencia a la fase estacionaria de un cultivo microbiano se inicia típicamente por alguna forma de limitación de nutrientes, típicamente la limitación de nitrógeno. Los inventores, sin embargo, sorprendentemente encontraron que con las diatomeas, particularmente las diatomeas que se pueden cultivar heterotróficamente, esto a menudo no es el caso y la limitación de nutrientes puede dar como resultado la producción de moléculas no deseadas en lugar de los productos para los que se está cultivando el cultivo. Sorprendentemente, los inventores alcanzaron una productividad volumétrica mucho mayor de la biomasa y ciertos productos deseados, como los HUFA, cuando los nutrientes no fueron limitados y el cultivo se mantuvo en una fase logarítmica de crecimiento.
45

Un cultivo es continuo cuando se agrega continuamente un medio de cultivo recién preparado, mientras que un cultivo activo que se mantiene con un crecimiento en fase logarítmica se retira continuamente para mantener constante el volumen del cultivo. Un cultivo semicontinuo se produce cuando un volumen del cultivo activo (es decir, la actividad de las células que crece en fase logarítmica en un medio de cultivo) se retira a intervalos de tiempo regulares o, al menos, periódicos, y se agrega un volumen igual o sustancialmente similar (es decir, aproximadamente equivalente) del medio recién preparado de nuevo al cultivo para reemplazar el que se ha retirado de modo que el volumen medio del cultivo activo se mantiene sustancialmente constante en el tiempo del cultivo. Para un cultivo semicontinuo es habitual retirar primero una parte del cultivo activo antes de reemplazar el volumen con un medio de cultivo recién preparado, ya que esta secuencia de eventos no requiere de ningún espacio adicional en el recipiente fermentador. Sin embargo, es posible revertir la secuencia de eventos si hay beneficios comerciales particulares para hacerlo. Para evitar dudas, a menos que el contexto exija claramente lo contrario, a lo largo de la descripción y las reivindicaciones, se debe tomar la referencia de que "cultivo continuo" o "cultivo continuo o similar" incluyen tanto un cultivo continuo como un cultivo semicontinuo.
50
55

Todo experto en la técnica es consciente de que el medio de cultivo requiere nutrientes para permitir y mantener el crecimiento del microbio. Un medio de cultivo comprenderá una fuente de nitrógeno, (por ejemplo, entre otras, iones de amonio, nitrato, extracto de levadura, harina de soja, peptona, triptona), una fuente de fosfato y una fuente de azufre. Sin embargo, para el crecimiento de las diatomeas el medio de cultivo también es necesario proporcionar una fuente de sílice, ya que la sílice es la base de las paredes celulares de todas las diatomeas. El medio de cultivo contiene además uno o más de: magnesio, calcio, cobalto, manganeso, boro, zinc, molibdeno, hierro, cromo, níquel, selenio, cobre y vitaminas. Será evidente para todo experto en la técnica que los nutrientes en el medio de cultivo de las diatomeas serán significativamente diferentes de los de otros microorganismos. Sin embargo, cuando se proporciona la guía en la presente aplicación, todo experto en la técnica puede ser consciente o utilizar la experimentación para determinar los componentes requeridos en el medio de cultivo sin limitar el crecimiento de las diatomeas.

Sin embargo, sorprendentemente, los inventores han descubierto que existen diferencias clave en la forma en que un medio debe diseñarse para apoyar el cultivo continuo. Tradicionalmente, la limitación en un solo nutriente se puede utilizar para determinar cuánto de este nutriente particular se requiere para preparar un cierto peso en seco de biomasa. Para los cultivos continuos, sin embargo, los inventores han descubierto que el medio está diseñado preferentemente para que el cultivo activo permanezca en fase logarítmica. Los inventores han encontrado que esto da como resultado mayores requerimientos de nutrientes sobre una base de peso de células en seco por gramo. En los métodos de la invención, el medio de cultivo preferentemente está diseñado para proporcionar todos los nutrientes esenciales en cantidades que mantengan las diatomeas en un crecimiento en fase logarítmica, o cerca de éste.

Sorprendentemente, los inventores han encontrado que no es suficiente simplemente con tomar procesos que operen a bajas densidades de cultivo y escalar después la concentración de nutrientes en el medio de cultivo para producir más biomasa; debe ser dada particularmente una cuidadosa atención para cultivar el diseño de medios. Los inventores han descubierto que a bajas densidades de cultivo, los desequilibrios en los nutrientes son relativamente poco importantes ya que las concentraciones de compuestos son generalmente bajas. Sin embargo, para un crecimiento rápido y continuo a alta densidad de biomasa (como se muestra en la presente invención), la provisión de nutrientes debe estar estrechamente adaptada a las necesidades del organismo mientras crece en la fase logarítmica. Para lograr altas densidades de cultivo, se requieren concentraciones relativamente altas de nutrientes, pero los inventores también han encontrado que los nutrientes proporcionados en exceso a las diatomeas también pueden acumularse con el tiempo a niveles en los que alteran la composición de la biomasa y/o inhiben la tasa de crecimiento. Ciertos requisitos celulares como el zinc o el cobre pueden ser tóxicos para las diatomeas cuando se proporcionan a una concentración demasiado alta. La adición de sales de cobre, por ejemplo, es un método bien establecido para matar las diatomeas y evitar su nuevo crecimiento en estanques, lagunas y piscinas. Las diatomeas parecen ser inesperadamente susceptibles al sobreaprovisionamiento de una serie de nutrientes que tienen efectos tóxicos a alta concentración.

Los nutrientes que se infrasuministran se agotan en el transcurso de varias recuperaciones del producto consecutivas, lo que de nuevo da como resultado cambios indeseables en la composición de la biomasa o alteraciones en el crecimiento. Los inventores han constatado que, si bien, en determinadas circunstancias, pueden ser deseables ligeras limitaciones de uno o más nutrientes, por ejemplo, si resulta en una mayor proporción de HUFA en la biomasa, en general la reducción de la tasa de crecimiento (es decir, la transferencia a una fase estacionaria) es indeseable. Por lo tanto, los inventores han constatado que debe prestarse una particular atención a elementos del medio, como trazas de metales y fosfato, para los que las diatomeas pueden tener almacenamientos internos significativos, ya que el agotamiento de estos se producirá en un período de tiempo más largo.

Incluso si se ha logrado un equilibrio de nutrientes correcto a un nivel particular de productividad de la biomasa, no se puede simplemente duplicar el nivel de todos los ingredientes en el medio y esperar el doble del nivel de productividad de la biomasa. La adición de algunos ingredientes, como una menor fuente de carbono, puede estar directamente relacionada con la cantidad de biomasa que se produce, pero también puede tener un efecto inhibitorio sobre el crecimiento a concentraciones más altas. Como consecuencia, las estrategias de alimentación tienen que hacerse evolucionar para mejorar este problema fundamental. Por ejemplo, puede ser preferible proporcionar un medio de cultivo de reemplazo para las diatomeas en porciones discretas a lo largo del tiempo en lugar de reemplazar todo el volumen del producto recuperado a la vez. Algunos ingredientes como el cloruro de sodio, por ejemplo, están presentes para el equilibrio osmótico del medio y, por lo tanto, no se proporcionan directamente en proporción a la biomasa producida. Algunos nutrientes, como el zinc, deben mantenerse dentro de un cierto intervalo de concentraciones. Tanto unas tasas de crecimiento demasiado bajas como caídas en las tasas de crecimiento y efectos demasiado altos y tóxicos originan un menor crecimiento del cultivo y, finalmente, hasta su propia muerte. Algunos nutrientes, como el potasio, desempeñan un papel doble, por lo que hay que hacer un equilibrio entre, por ejemplo, su efecto osmótico, y su uso como nutriente. Si bien las cantidades de nutrientes en el cultivo dependen del microbio utilizado y del volumen de cultivo, de acuerdo con la guía y descripción de la presente aplicación de que es recomendable mantener a las células diatomeas en crecimiento en fase logarítmica en los cultivos continuos, y que además esto requiere una composición de medios diferente a la requerida para las fermentaciones normales, todo experto en la técnica es capaz de utilizar la experimentación de rutina para determinar las cantidades de los componentes requeridos en el medio de cultivo en crecimiento en fase logarítmica o cerca de ésta. Por ejemplo, los

inventores han mostrado en el Ejemplo 8 un ejemplo de un procedimiento para determinar la cantidad de azufre necesaria para mantener un crecimiento activo en fase logarítmica de una diatomea.

Un asunto particular cuando se trata de cultivos de diatomeas es la provisión de silicatos. Incluso a concentraciones relativamente modestas, los inventores han encontrado que el silicato puede interactuar con otros ingredientes medios para formar precipitados y geles, eliminando tanto a este mismo como a otros nutrientes de la solución y haciéndolos no disponibles para su uso por las diatomeas. A medida que aumenta la cantidad de biomasa que se produce, es necesario prestar una atención especial a la adición del silicato (que se proporciona proporcionalmente a la biomasa que se va a producir) para evitar que esto ocurra. El silicato se añade preferentemente de forma continua durante el curso del cultivo para ayudar en la reducción de la formación de precipitados de silicato, y para prestar ayuda a la hora de proporcionar una cantidad de silicatos y mantener el cultivo en un crecimiento en fase logarítmica, o cercano a éste, (por ejemplo, un método de adición de silicato se describe en el documento WO2012/053912). La fuente de silicato es preferiblemente un silicato de metal alcalino, por ejemplo (entre otros) silicato de sodio o silicato de potasio. En las realizaciones preferidas, el silicato de sodio se añade continuamente a un nivel de entre 20 y 120 mg de metasilicato de sodio pentahidrato por cada gramo de peso celular en seco de biomasa producida en el cultivo, más preferiblemente entre 40 y 100 mg de metasilicato de sodio pentahidrato por gramo de peso celular en seco de biomasa producida, y lo más preferiblemente 75 mg de metasilicato de sodio pentahidrato para cada gramo de peso de célula en seco de biomasa producida en el cultivo.

Los inventores han descubierto que es posible cultivar continuamente diatomeas a altas densidades, en la región de 20 g de Peso de Célula en Seco (DCW)/L o superior, por ejemplo de 20 a 150g DCW/L o, más preferiblemente, de 30 a 100 g DCW/L, aún más preferiblemente de 30 a 70 g DCW/L. Preferiblemente el peso de la célula en seco del cultivo en el momento de recuperar el producto permanece dentro de +/- 5% de la media de las recuperaciones del producto durante el tiempo por el cual el cultivo se realiza con el fin de mantener una alta densidad de diatomeas en el cultivo. Tales densidades de diatomeas en el cultivo continuo de la invención permiten generar altas tasas de producción volumétricas de al menos 20 gramos de DCW de biomasa por litro de cultivo activo por día (DCW/L/día) (es decir, 20 gramos de biomasa producida por litro de cultivo activo en el recipiente de fermentación al día), más preferiblemente al menos 30 gramos de DCW de biomasa por litro de cultivo activo al día, pero se puede optimizar utilizando la enseñanza de la presente aplicación para ser tan alto como 50 g DCW/L/día de biomasa, más preferiblemente 60 g DCW/L/día de biomasa, aún más preferiblemente 70 g DCW/L/día de biomasa o más. Por lo tanto, el intervalo de las tasas de producción es cualquiera de los valores mínimos preferidos para cualquiera de los valores máximos preferidos, por ejemplo (entre otros), de 20 a 50 g DCW/L/día de biomasa, más preferiblemente de 20 a 60 g DCW/L/día de biomasa, más preferiblemente de 20 a 70 g DCW/L/día de biomasa.

Los cultivos continuos de los métodos de la invención incluyen preferentemente la sustitución de al menos el 50% en volumen del cultivo activo cada 24 horas, más preferiblemente al menos el 60% en volumen. Los métodos alternativamente incluyen la sustitución de al menos el 10% en volumen del cultivo activo cada 4 horas, más preferiblemente al menos 12% en volumen, más preferiblemente al menos 15% en volumen. En otra alternativa, los métodos de la invención incluyen preferentemente la sustitución de al menos el 5% en volumen del cultivo activo cada 2 horas, más preferiblemente al menos un 6% en volumen, más preferiblemente al menos un 7% en volumen. En otra alternativa, los métodos de la invención incluyen preferentemente la sustitución de al menos el 0,2% por volumen del cultivo activo cada 5 minutos, más preferiblemente al menos un 0,3%, más preferiblemente al menos un 0,35% en volumen. El volumen de recuperación del producto y sustitución debe elegirse para que coincida con una tasa de crecimiento del organismo en fase logarítmica para que la densidad del cultivo en recuperaciones del producto secuenciales no caiga y el cultivo no entre en fase estacionaria. Al tiempo que se proporciona una recuperación del producto semicontinua cada 24, 4 y 2 horas y una recuperación del producto continua a través de ejemplos, cualquier intervalo de menos de 24 horas que permita que las células permanezcan en crecimiento logarítmico se puede utilizar, de modo que el intervalo entre las recuperaciones del producto se pueda elegir para adaptarse a las necesidades de procesamiento aguas abajo. Aunque se ha observado que, para un peso en seco dado en la recuperación del producto y la tasa de crecimiento, recuperaciones del producto más frecuentes proporcionan una productividad de biomasa más alta.

En algunos casos, los métodos de cultivo anteriores han utilizado la perfusión para aumentar la densidad y la productividad de los cultivos de microbios. La perfusión ocurre cuando se separan las células y el medio del cultivo activo, las células se devuelven al fermentador y se añade otro medio recién preparado. Los métodos de la presente invención no incluyen preferentemente la perfusión del cultivo activo, ya que este procedimiento añade otros costes y procedimientos que no serían prácticos a escala industrial para la producción de biomasa. Los cultivos de perfusión también son extremadamente susceptibles a la contaminación y requieren medidas extraordinarias para mantener los cultivos axénicos durante largos períodos de tiempo. El mantenimiento de la esterilidad es importante porque los organismos contaminantes invasores, que crecen más rápidamente que el organismo de producción, pueden llegar rápidamente a dominar el cultivo en el curso de varias recuperaciones del producto hasta tal punto que el cultivo termina por ser abandonado. Los métodos de la invención sorprendentemente proporcionan un cultivo de alta productividad, sin necesidad de perfusión. Si bien los inventores han encontrado que se debe tener cuidado de mantener los contaminantes fuera del fermentador durante la puesta en operación de los métodos de la invención, particularmente tanto en la recuperación del producto de cultivo como en la recarga de medios recién preparados, este problema se reduce por la falta de necesidad de perfusión.

Los inventores han demostrado que los métodos de la invención pueden llevarse a cabo a escalas de al menos 12 litros de cultivo activo, más preferiblemente al menos 14 litros de cultivo activo, más preferiblemente al menos 400 litros de cultivo activo, aún más preferiblemente al menos 500 litros de cultivo activo. Sin embargo, una vez provisto de la descripción de la presente aplicación los cultivos a mayor escala, tales como al menos 10,000 litros, al menos 100,000 litros, e incluso al menos 200,000 litros se pueden utilizar para la producción industrial.

Para ser comercialmente viables, los cultivos continuos de la invención son preferiblemente sostenibles durante un período de tiempo. Los inventores han demostrado que los métodos de la invención pueden mantenerse durante al menos 72 horas (3 días), más preferiblemente al menos 5 días, aún más preferiblemente una semana (7 días), aún más preferiblemente al menos un mes (30 días), más preferiblemente al menos 2 meses (60 días). Para un cultivo semicontinuo el ciclo de eliminación de una porción de cultivo activo y la sustitución del medio de cultivo recién preparado se repite preferentemente al menos 5 veces. Sin embargo, en los ejemplos de la invención previstos en la presente aplicación (véanse los ejemplos 1-5), los cultivos se suspendieron después de 60 días (después de la eliminación del cultivo activo y la sustitución por un medio recién preparado más de 100 veces) sin ninguna indicación de que los cultivos pudieran mantenerse durante más tiempo. Por lo tanto, no hay indicios de que los cultivos no puedan de hecho continuar durante períodos de meses o años sin problemas. En una realización preferida, la tasa media de producción volumétrica de biomasa es de al menos 20 g de peso seco/L/día durante un período de al menos 72 horas (3 días), más preferiblemente al menos una semana (7 días), más preferiblemente al menos un mes (30 días), aún más preferiblemente al menos 2 meses (60 días).

Preferiblemente los métodos de la invención comprenden cultivar una diatomea identificada. Preferiblemente se selecciona la cepa de diatomea, cuando en condiciones de cultivo, para una capacidad de producción de al menos un HUFA, preferiblemente EPA y/o DHA. Todo experto en la técnica será consciente de las especies de diatomeas que son capaces de producir HUFA, o que sería capaz de llevar a cabo experimentos rutinarios para determinar esto (por ejemplo, véase Dunstan et al. (1993) *Phytochemistry* 35:155-161). En las realizaciones preferidas, la diatomea se selecciona, por ejemplo, entre una especie de *Nitzschia*, una especie *Cyclotella* o una especie *Phaeodactylum*. Más preferiblemente, la diatomea es *Nitzschia laevis*, por ejemplo (entre otras) la cepa In1CS20 de *Nitzschia laevis*.

Todo experto en la técnica debe ser consciente de los métodos utilizados para "sembrar" la fermentación con el microbio requerido. La fermentación se llevará a cabo generalmente en un recipiente de fermentación, u otro recipiente adecuado como sería evidente para todo experto en la técnica.

La biomasa de diatomeas producida por los métodos de la presente invención se encuentra en un estado metabólico (fase de crecimiento logarítmica) que es muy diferente en composición de los cultivos en fase estacionaria. Cuando se utilizan diatomeas capaces de producir ácidos grasos altamente insaturados (HUFA), estas condiciones dan lugar a niveles relativamente altos de uno o más HUFA. Más preferiblemente, el HUFA es EPA, pero también puede ser beneficioso una mezcla de más de un HUFA, preferiblemente EPA, DHA y ARA, más preferiblemente EPA y DHA. Tanto EPA como DHA son ácidos grasos omega-3 y se sabe que tienen propiedades para la salud particularmente beneficiosas. Estos ácidos grasos, o sus formas esterificadas, se pueden utilizar como productos farmacéuticos, alimentos médicos, aditivos alimenticios o alimentos, productos cosméticos, o suplementos nutricionales. ARA es un ácido graso omega-6 y también se sabe que tiene propiedades beneficiosas para la salud. Preferiblemente la biomasa de diatomeas contiene un nivel total de HUFA (que puede estar compuesto por una mezcla de diferentes HUFA) de al menos el 2% del peso celular en seco de la biomasa, más preferiblemente al menos el 3% del peso celular en seco de la biomasa. Más preferiblemente, la biomasa de diatomeas contiene una mezcla de EPA y DHA a un nivel de al menos 2% de peso celular en seco de la biomasa, aún más preferiblemente al menos el 3% de peso celular en seco de la biomasa. Al menos un HUFA se produce preferentemente por los métodos de la invención a un nivel de al menos el 2% de peso celular en seco de la biomasa (es decir, un solo HUFA a un nivel del 2%), más preferiblemente al menos el 2,5% de peso celular en seco de la biomasa, más preferiblemente al menos el 2,7% de peso celular en seco de la biomasa, incluso más preferiblemente al menos el 3,2% de peso celular en seco de la biomasa. El HUFA producido es más preferiblemente EPA. El nivel máximo de HUFA total o HUFA único en la biomasa dependerá de la puesta a punto de las condiciones y la elección de la diatomea, una vez que el experto en la técnica proporcione la descripción en la memoria descriptiva. Sin embargo, los inventores creen que es probable que el límite máximo esté en la región del 5%, más preferiblemente el 10%, más preferiblemente el 15%, incluso más preferiblemente el 20% de peso celular en seco. El intervalo del contenido de uno o más HUFA en la biomasa es, por lo tanto, cualquiera de los valores mínimos preferidos para cualquiera de los valores máximos preferidos, por ejemplo (entre otros), el nivel de HUFA es preferiblemente del 1 al 20% de peso celular en seco de la biomasa, más preferiblemente del 2 al 15% de peso celular en seco de la biomasa, más preferiblemente del 2 al 10 % de peso celular en seco de la biomasa, más preferiblemente del 2,7 al 10% de peso celular en seco de la biomasa, más preferiblemente entre el 3,2 y el 10% de peso celular en seco de la biomasa.

La técnica actual muestra que la mayoría de las microalgas deben ser cultivadas fotosintéticamente para producir HUFA. En un aspecto particularmente preferido de la invención, los inventores han encontrado sorprendentemente que las diatomeas son capaces de ser cultivadas heterotróficamente utilizando la fermentación continua para producir HUFA a una alta productividad. Esto permite una producción comercial sin necesidad de proporcionar luz para la fermentación a alta densidad, superando así los problemas de ingeniería asociados con una provisión suficiente de luz a los cultivos de alta densidad previamente discutidos. Cuando las diatomeas se cultivan heterotróficamente, se proporciona preferiblemente una menor fuente de carbono en el medio de cultivo.

Preferiblemente la menor fuente de carbono se selecciona (entre otras) de uno o más de: glucosa, fructosa, jarabe de maíz de alta concentración de fructosa, monosacáridos, disacáridos, alcoholes, ácido acético o sus sales.

La técnica actual muestra que, para obtener una alta productividad volumétrica de HUFA, se deben utilizar condiciones de lotes o lotes alimentados cuando las células se toman en fase estacionaria, en las cuales se induce un estado de oleogénesis, generalmente mediante el uso de la limitación de nitrógeno y/o fosfato y la composición de la biomasa de algas es, por lo tanto, significativamente diferente de las composiciones de biomasa que crecen en fase logarítmica. En un aspecto particularmente preferido de la invención, los inventores han determinado sorprendentemente que las diatomeas se pueden cultivar heterotróficamente utilizando una fermentación continua de la diatomea mantenida en fase logarítmica para producir HUFA a una alta productividad volumétrica. Esto permite la producción comercial de organismos, como las diatomeas, que son inadecuadas para la fermentación por lotes o fermentación por lotes de alimentación, superando así los problemas con el crecimiento a escala.

Los inventores también han encontrado que el pH de cultivo se mantiene preferiblemente dentro del intervalo de 7,0 a 9,0, más preferiblemente dentro del intervalo de 7,5 a 8,5, más preferiblemente dentro del intervalo de 8,0 a 8,5. La temperatura del cultivo se mantiene preferiblemente entre 15 y 30°C, más preferiblemente a una temperatura de entre 20 y 25°C. Se proporciona preferiblemente agitación y/o contrapresión para mantener un nivel de oxígeno disuelto en un nivel del 10% o por encima de éste, más preferiblemente 20%, incluso más preferiblemente 30% de saturación de aire. El nivel de oxígeno disuelto se mantiene aún más preferiblemente en un 40% de saturación de aire o por encima. Estas condiciones promueven el crecimiento de la formación de diatomeas y HUFA (cuando se utiliza una diatomea capaz de producir HUFA). Los niveles de oxígeno disueltos se mantienen preferentemente durante al menos el 80%, más preferiblemente el 90% del tiempo de cultivo. Las breves caídas por debajo de los niveles de oxígeno disuelto preferidos se consideran dentro del ámbito de la presente invención, ya que no deben afectar significativamente al cultivo.

La invención también incluye un cultivo activo (es decir, un crecimiento de actividad para las células diatomeas en fase logarítmica en el medio de cultivo) en un cultivo continuo que, antes de la separación de la biomasa por etapas de extracción o purificación, incluirá en el medio de cultivo las diatomeas a una densidad de biomasa de al menos 20 g/L. Preferiblemente, cuando se utiliza una diatomea capaz de producir HUFA, la biomasa de diatomeas contiene un ácido graso altamente insaturado (HUFA).

Tras la separación en porciones del cultivo activo del cultivo continuo, el componente de biomasa de diatomeas se concentra preferentemente para eliminar o separar sustancialmente el componente líquido y producir un concentrado de biomasa, por ejemplo mediante una centrifugación a secas o una centrifugación continua u otros medios conocidos en la técnica de la recuperación de la biomasa, por ejemplo, como la centrifugación, floculación, filtración y/o flotación. Las células de la biomasa también pueden lavarse opcionalmente para eliminar el exceso de medio y/o eliminarlas por tratamiento térmico (por ejemplo, pasteurización) o con otros modos (por ejemplo, desnaturalizando enzimas endógenas que puedan hacer disminuir el rendimiento del producto). La biomasa se seca opcionalmente para reducir o eliminar el agua, por ejemplo, mediante un secado por pulverización, liofilización, secado con túneles, secado al vacío y/o secado en tambor. La biomasa seca se muele opcionalmente para formar un polvo fino, u opcionalmente se forma en peletes. Alternativamente, la porción del cultivo activo extraída del cultivo continuo puede secarse directamente sin preconcentración.

La biomasa de diatomeas de la invención puede ser sometida a uno o más pasos de extracción para extraer los productos deseados, por ejemplo HUFA o ésteres de los mismos, de la biomasa para producir una composición (ejemplo de una composición HUFA). Las técnicas de extracción adecuadas son habituales en la técnica y dependerán del producto deseado. Por ejemplo, para extraer un HUFA, la biomasa puede extraerse con un disolvente lipídico no selectivo (por ejemplo, cerca de un éter dimetilo crítico o etanol) y recuperarse del disolvente como residuo. Alternativamente, la biomasa puede extraerse utilizando otros disolventes polares o no polares, incluyendo, entre otros, hexano, alcohol, acetona, dióxido de carbono supercrítico o líquido, o mezclas de los mismos (por ejemplo, hexano e isopropanol). La biomasa se puede extraer con disolventes, ya sea en un lote o de forma contracorriente. El disolvente (que contiene el HUFA) se separa de la biomasa extraída, por ejemplo (entre otros) por sedimentación, filtración, centrifugación. El HUFA (o éster del mismo) se recupera del disolvente.

El HUFA presente en la biomasa está en forma de ácidos grasos libres y/o formas esterificadas del ácido graso. Ejemplos de formas esterificadas del ácido graso incluyen triglicéridos, fosfolípidos, y glucolípidos (colectivamente conocidos como lípidos). Los lípidos son la forma nativa del HUFA, (es decir, la forma que se encuentra naturalmente en la biomasa antes de cualquier modificación química externa). Los ácidos grasos libres se dividen de los lípidos mientras todavía están en la biomasa (por ejemplo, por la acción de las enzimas), o pueden opcionalmente escindirse de los lípidos (por ejemplo, para formar un éster alternativo, o al ácido graso libre) durante los pasos de extracción, enriquecimiento y/o purificación.

Después de la extracción, el paso adicional del enriquecimiento de HUFA o la purificación de uno o más HUFA de la mezcla se puede realizar utilizando las técnicas habituales en la técnica. Por ejemplo, el material extraído puede tratarse con ácidos, álcalis y/o enzimas en presencia de alcohol o agua para formar ácidos grasos libres o ésteres de alquilo de ácidos grasos. Por ejemplo, el HUFA puede ser transesterificado para formar el éster etílico del ácido graso (FAEE). El éster puede ser purificado opcionalmente con el fin de lograr un estándar requerido de pureza.

Algunos ejemplos de procesos de purificación son la cromatografía, la destilación molecular y/o la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para evitar dudas, la HPLC a veces se conoce como cromatografía líquida de alta presión. Alternativamente los lípidos en la biomasa se saponifican para formar los ácidos grasos libres. Los ácidos grasos libres se purifican o separan opcionalmente, por ejemplo, por cromatografía (entre otros). El HUFA, purificado en forma de ácido graso libre, puede ser utilizado como tal o convertido en un éster etílico (FAEE) utilizando procesos habituales en la técnica.

Después de la purificación del HUFA, o el éster del mismo, el HUFA puede utilizarse después para diversas aplicaciones de alimentos o alimentación adecuadas para el consumo humano y/o animal, incluidos, entre otros, productos farmacéuticos, alimentos médicos, aditivos alimentarios, productos cosméticos, suplementos dietéticos o aditivos alimenticios. En algunos casos la propia biomasa se puede utilizar para diversas aplicaciones de alimentos o alimenticias incluyendo, entre otras, productos farmacéuticos, alimentos médicos, aditivos alimentarios, productos cosméticos, suplementos dietéticos, o aditivos alimenticios.

Mediante el uso de los métodos de la invención para proporcionar un cultivo controlado de una diatomea, un producto HUFA puede proporcionarse de forma consistente, sostenible y trazable (es decir, mediante buenos procesos de fabricación) sin que exista una preocupación por los contaminantes ambientales, todos los cuales se propagan en el aceite de pescado como fuente de productos HUFA similares.

Definiciones y abreviaturas

El ácido graso altamente insaturado (HUFA) es un ácido graso que contiene 20 carbonos o más, con 4 o más enlaces dobles. Pueden ser omega-3 u omega-6.

Los ácidos grasos se describen en la forma CX:Y, donde el número X describe el número de átomos de carbono y el número Y describe el número de enlaces dobles en el ácido graso. Cuando Y es igual a cero el ácido graso se describe como saturado, cuando Y es mayor que cero el ácido graso se describe como insaturado. La posición y el tipo de los enlaces dobles pueden especificarse como, por ejemplo, "cis 5, 11, 14" donde los números reflejan la ubicación de los enlaces dobles de carbono:carbono, contando desde el extremo del ácido carboxílico de la molécula.

A menos que el contexto exija claramente lo contrario, a lo largo de la descripción y las reivindicaciones, se debe referirse al "ácido graso" cuando se incluyan tanto los ácidos grasos libres como las formas esterificadas del ácido graso que son adecuadas para uso humano (por ejemplo, para el consumo o aplicaciones tópicas). Ejemplos de formas esterificadas del ácido graso que son adecuadas para el consumo humano incluyen triglicéridos, fosfolípidos, glucolípidos y ésteres etílicos. Los ésteres metílicos son desfavorables en las composiciones para el consumo humano porque liberan metanol en el cuerpo durante el procesamiento en el intestino humano y, por lo tanto, no son preferidos dentro de las composiciones y los métodos para la producción. Un término como C20:5, por ejemplo, se entiende que incluye tanto el ácido graso libre como las formas esterificadas del ácido graso (sin incluir ésteres de metilo) haciendo referencia el número de átomos de carbono y enlaces dobles únicamente a la porción de ácidos grasos del éster.

El ácido graso omega-3 es un ácido graso con el primer doble enlace de tres átomos de carbono del extremo metilo (el extremo omega) de la molécula. Omega-3 a menudo se acorta a n-3 ambos términos se utilizan en este documento indistintamente.

El ácido graso omega-6 es un ácido graso con el primer doble enlace seis átomos de carbono del extremo metilo de la molécula. Omega-6 a menudo se acorta a n-6.

EPA, C20:5 n-3, ácido eicosapentaenoico, es un ácido graso omega-3 con veinte átomos de carbono y cinco enlaces dobles.

ARA, C20:4 n-6, ácido araquidónico, es un ácido graso omega-6 con veinte átomos de carbono y cuatro enlaces dobles.

DHA, C22:6 n-3, ácido docosahexaenoico, es un ácido graso omega-3 con veintidós átomos de carbono y seis enlaces dobles.

DCW, peso de la célula en seco, significa el peso de una biomasa una vez que se ha eliminado toda el agua.

Fase logarítmica o crecimiento logarítmico se utiliza como sinónimo de crecimiento exponencial a lo largo de esta descripción y ambos se utilizan de forma similar a las definiciones habituales en la técnica.

Cultivo heterotrófico significa un cultivo de organismos para los cuales al menos el 90% del suministro de energía para el cultivo se deriva de nutrientes suministrados que suelen ser una forma o varias formas en las que se presenta el carbono orgánico (por ejemplo, glucosa, acetato). Por lo tanto, un máximo del 10% del suministro de energía puede derivarse de energía lumínica. Preferiblemente, menos del 5% o más preferiblemente menos del 1%

del suministro de energía se deriva de la energía lumínica. Más preferiblemente, el suministro total de energía proviene de nutrientes suministrados.

Cultivo activo significa una biomasa con cierta actividad celular que crece en fase logarítmica en un medio de cultivo contenido en un recipiente adecuado, por ejemplo, un fermentador.

- 5 Cultivo fotoautotrófico (o microbios fotoautotróficos o diatomeas) significa un cultivo de organismos para los que la única fuente de energía es la luz.

La limitación de nutrientes significa que la ausencia o el bajo nivel del nutriente en cuestión hace que el organismo se someta a cambios metabólicos que no se producirían si el nutriente estuviera presente a niveles más altos y es esencialmente la entrada en la fase estacionaria de un cultivo. Un cultivo se considera en una condición de nutrientes no limitante si el crecimiento procede de una manera logarítmica.

- 10 A menos que el contexto exija claramente lo contrario, a lo largo de la descripción y las reivindicaciones, se hace referencia a "cultivo continuo" o a "cultivo continuamente" cuando se incluye tanto un cultivo continuo estrictamente hablando (en el que el medio de cultivo recién preparado se añade continuamente, mientras que en un cultivo activo se elimina éste continuamente para mantener el volumen del cultivo constante) como un cultivo semicontinuo (cuando se elimina un volumen de cultivo activo a intervalos de tiempo regulares o, al menos, periódicos y se añade un volumen igual o sustancialmente similar de medio recién preparado al cultivo para reemplazar el que se ha eliminado; de tal manera que el volumen medio de cultivo activo permanece sustancialmente constante en el tiempo del cultivo). Para un cultivo semicontinuo es habitual eliminar primero una parte del cultivo activo antes de reemplazar el volumen por un medio de cultivo recién preparado, ya que esta secuencia de eventos no requiere ningún espacio adicional en el recipiente del fermentador. Sin embargo, es posible invertir la secuencia de eventos.

A menos que el contexto exija claramente lo contrario, a lo largo de la descripción y las reivindicaciones, "diatomeas" o "diatomea" hace referencia a la inclusión de todos los organismos de la clase Bacillariophyceae, incluyendo, entre otros, diatomeas pinadas (por ejemplo, *Nitzschia*) y céntricas (por ejemplo, *Cyclotella*).

- 25 A menos que el contexto exija claramente lo contrario, a lo largo de la descripción y las reivindicaciones, las palabras "comprende", "que comprende" y similares, deben interpretarse en un sentido inclusivo en lugar de en un sentido exclusivo o exhaustivo, es decir, en el sentido de "que incluyen, entre otros".

- 30 Se pretende que la referencia a una serie de números descritos en el presente documento (por ejemplo, del 1 al 10) también incorpore la referencia a todos los números racionales dentro de ese intervalo (por ejemplo, 1, 1,1, 2, 3, 3,9, 4, 5, 6, 6,5, 7, 8, 9 y 10) y también cualquier intervalo de números racionales dentro de ese intervalo (por ejemplo, de 2 a 8, de 1,5 a 5,5 y de 3,1 a 4,7).

Ejemplos

Ejemplo 1 - Cultivo semicontinuo de *Nitzschia laevis*.

- 35 Un cultivo de la cepa In1CS20 de *Nitzschia laevis* fue cultivado en un cultivo de 14L en un recipiente agitado de 20L. El pH se mantuvo a 8,0 o más por la adición de NaOH, la temperatura se mantuvo en 20°C, y la presión se mantuvo en aproximadamente 500 mbar por encima de la presión atmosférica. Se proporcionó agitación para mantener disuelto oxígeno por encima del 40% de saturación.

- 40 Las células fueron cultivadas hasta una densidad de aproximadamente 40 g de peso celular en seco por litro de cultivo y la recuperación de producto fue iniciada. Cada 4 horas, 1,4 litros de cultivo se retiran del recipiente como recuperación del producto, y el volumen se recupera en hasta 14L con alimentaciones por hora de aproximadamente 400 ml de medio recién preparado. Esto se mantuvo durante 7 días.

El medio recién preparado estaba compuesto por:

	g/L
Monohidrato de glucosa	95
Nitrato de sodio NaNO ₃	10,1
45 Extracto de levadura	3,1
Na ₂ HPO ₄	1,16
Cloruro de sodio NaCl	8,4
Cloruro de potasio KCl	1,17
Sulfato de magnesio heptahidrato MgSO ₄ ·7H ₂ O	4,9

	Cloruro de calcio dihidrato $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,204
	Sulfato de sodio	0,586
		mg/L
5	Cloruro de cobalto hexahidrato $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,081
	Cloruro de manganeso 4-hidrato $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,843
	Ácido bórico H_3BO_3	103,1
	Cloruro de zinc ZnCl_2	1,05
	Molibdato de sodio dihidrato $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,363
10	Cloruro férrico hexahidrato	7,22
	Citrato	675
	Sulfato de cobre	0,024
	Vitamina B12	202,7
	Tiamina	0,34
15	Biotina	0,34

Además de las alimentaciones por hora, también se proporcionó al cultivo metasilicato de sodio como una alimentación separada, casi continua, de tal manera que se proporcionara en torno al 7,5% de metasilicato sódico (pentahidrato)/peso de células en seco.

20 La densidad óptica del cultivo se registró cada 10 minutos y se mantuvo dentro de un intervalo +/-2% del promedio durante un período de 7 días. El peso de las células en seco del cultivo (DCW) se midió a partir de una muestra adicional de 100 ml tomada en el momento de recuperar el producto uno en cuatro de los siete días. Esta muestra también se utilizó para el análisis de su composición.

25 Las medidas del peso de células en seco se utilizaron para calcular el DCW en cada una de las otras recuperaciones del producto.

Al multiplicar el volumen de recuperación del producto por la DCW, se calcula la recuperación de biomasa y, por lo tanto, la productividad de la biomasa.

En la Tabla 1 que figura a continuación DCW y el contenido de EPA de la biomasa, que figura en cursiva, se calculan a partir de los datos medidos.

30 Tabla 1

	Día 1		
	DCW (g/L)	Recuperación del producto (L)	Biomasa recogida (g)
Recuperación del producto 1	42,0	1,5	63,0
Recuperación del producto 2	<i>41,6</i>	1,4	58,2
Recuperación del producto 3	<i>41,4</i>	1,4	58,0
Recuperación del producto 4	<i>41,3</i>	1,4	57,9
Recuperación del producto 5	<i>41,2</i>	1,4	57,7
Recuperación del producto 6	<i>41,1</i>	1,4	57,6

ES 2 825 062 T3

Productividad de la biomasa (g/L/día)	25,2
Contenido de EPA en la biomasa (%)	2,5
Productividad de la EPA (mg/L/h)	26,2

	Día 2		
	DCW (g/L)	Recuperación del producto (L)	Biomasa recogida (g)
Recuperación del producto 1	41,0	1,4	57,4
Recuperación del producto 2	40,8	1,4	57,2
Recuperación del producto 3	40,7	1,4	56,9
Recuperación del producto 4	40,5	1,4	56,7
Recuperación del producto 5	40,3	1,4	56,5
Recuperación del producto 6	40,2	1,4	56,2

Productividad de la biomasa (g/L/día)	24,3
Contenido de EPA en la biomasa (%)	2,5
Productividad de la EPA (mg/L/h)	25,4

	Día 3		
	DCW (g/L)	Recuperación del producto (L)	Biomasa recogida (g)
Recuperación del producto 1	40,0	1,5	60,0
Recuperación del producto 2	39,7	1,4	55,5
Recuperación del producto 3	39,6	1,4	55,5
Recuperación del producto 4	39,6	1,4	55,4
Recuperación del producto 5	39,6	1,4	55,4
Recuperación del producto 6	39,5	1,4	55,3

Productividad de la biomasa (g/L/día)	24,1
Contenido de EPA en la biomasa (%)	2,5
Productividad de la EPA (mg/L/h)	25,1

	Día 4		
	DCW (g/L)	Recuperación del producto (L)	Biomasa recogida (g)
Recuperación del producto 1	39,5	1,5	59,3
Recuperación del producto 2	39,3	1,4	55,1
Recuperación del producto 3	39,5	1,4	55,3

ES 2 825 062 T3

Recuperación del producto 4	39,6	1,4	55,5
Recuperación del producto 5	39,8	1,4	55,7
Recuperación del producto 6	39,9	1,4	55,9

Productividad de la biomasa (g/L/día)	24,1
Contenido de EPA en la biomasa (%)	2,5
Productividad de la EPA (mg/L/h)	25,1

	Día 5		
	DCW (g/L)	Recuperación del producto (L)	Biomasa recogida (g)
Recuperación del producto 1	40,1	1,4	56,1
Recuperación del producto 2	40,3	1,4	56,4
Recuperación del producto 3	40,5	1,4	56,7
Recuperación del producto 4	40,7	1,4	57,0
Recuperación del producto 5	40,9	1,4	57,3
Recuperación del producto 6	41,1	1,4	57,5

Productividad de la biomasa (g/L/día)	24,4
Contenido de EPA en la biomasa (%)	2,5
Productividad de la EPA (mg/L/h)	25,4

	Día 6		
	DCW (g/L)	Recuperación del producto (L)	Biomasa recogida (g)
Recuperación del producto 1	41,3	1,4	57,8
Recuperación del producto 2	41,5	1,4	58,1
Recuperación del producto 3	41,7	1,4	58,3
Recuperación del producto 4	41,8	1,4	58,6
Recuperación del producto 5	42,0	1,4	58,8
Recuperación del producto 6	42,2	1,4	59,1

Productividad de la biomasa (g/L/día)	25,1
Contenido de EPA en la biomasa (%)	2,5
Productividad de la EPA (mg/L/h)	26,1

	Día 7		
	DCW (g/L)	Recuperación del producto (L)	Biomasa recogida (g)
Recuperación del producto 1	42,4	1,5	63,6
Recuperación del producto 2	41,9	1,4	58,7
Recuperación del producto 3	41,8	1,4	58,5
Recuperación del producto 4	41,7	1,4	58,4
Recuperación del producto 5	41,6	1,4	58,2
Recuperación del producto 6	41,4	1,4	58,0

Productividad de la biomasa (g/L/día)	25,4
Contenido de EPA en la biomasa (%)	2,5
Productividad de la EPA (mg/L/h)	26,4

Ejemplo 2

- 5 El cultivo del Ejemplo 1 se restableció recuperando el 50% del volumen y permitiendo el crecimiento de nuevo a una densidad de aproximadamente 40 g de peso de células en seco por litro de cultivo antes de que se iniciara de nuevo la recuperación del producto.

- 10 Para este ejemplo se realizaron recuperaciones del producto de entre 0,7 y 0,8 L cada dos horas (el volumen del producto recuperado se ajusta para mantener el peso en seco en una recuperación del producto casi constante). El volumen se rellenó de nuevo hasta 14L con dos recargas; una de aproximadamente 400 mL de medio recién preparado inmediatamente después de recuperar el producto y otra que proporcionaba el volumen restante para alcanzar los 14L una hora más tarde. La composición del medio fue como en el ejemplo 1. El silicato fue alimentado al cultivo de la misma manera que se utiliza en el Ejemplo 1.

- 15 La densidad óptica del cultivo se registró cada 10 minutos y se mantuvo en un intervalo de +/- 2% de la media durante un período de 7 días. Se tomó otra muestra de 100 ml para determinar el peso de células en seco del cultivo y la composición de la biomasa en el momento de recuperar el producto en seis de los ocho días.

La productividad de la biomasa se calculó según el Ejemplo 1. En la Tabla 2, que figura a continuación, DCW y el contenido de EPA de la biomasa, que figura en cursiva, se calculan a partir de los datos medidos.

Tabla 2

	Día 1		
	DCW (g/L)	Recuperación del producto (L)	Biomasa Recogida (g)
Recuperación del producto 1	40,0	0,8	32,0
Recuperación del producto 2	39,7	0,7	27,8
Recuperación del producto 3	39,7	0,7	27,8
Recuperación del producto 4	39,7	0,7	27,8
Recuperación del producto 5	39,7	0,7	27,8
Recuperación del producto 6	39,7	0,7	27,8
Recuperación del producto 7	39,7	0,7	27,8
Recuperación del producto 8	39,8	0,7	27,8
Recuperación del producto 9	39,8	0,7	27,8

ES 2 825 062 T3

Recuperación del producto 10	39,8	0,7	27,8
Recuperación del producto 11	39,8	0,7	27,8
Recuperación del producto 12	39,8	0,7	27,9

Productividad de la biomasa (g/L/día)	24,1
Contenido de EPA en la biomasa (%)	2,6
Productividad de la EPA (mg/L/h)	26,2

	Día 2		
	DCW (g/L)	Recuperación del producto (L)	Biomasa recogida (g)
Recuperación del producto 1	39,8	0,9	35,8
Recuperación del producto 2	39,4	0,8	31,6
Recuperación del producto 3	39,4	0,8	31,5
Recuperación del producto 4	39,3	0,8	31,5
Recuperación del producto 5	39,3	0,8	31,4
Recuperación del producto 6	39,2	0,8	31,4
Recuperación del producto 7	39,1	0,8	31,3
Recuperación del producto 8	39,1	0,8	31,3
Recuperación del producto 9	39,0	0,8	31,2
Recuperación del producto 10	39,0	0,8	31,2
Recuperación del producto 11	38,9	0,8	31,1
Recuperación del producto 12	38,9	0,8	31,1

Productividad de la biomasa (g/L/día)	27,2
Contenido de EPA en la biomasa (%)	2,5
Productividad de la EPA (mg/L/h)	28,3

	Día 3		
	DCW (g/L)	Recuperación del producto (L)	Biomasa recogida (g)
Recuperación del producto 1	38,8	0,9	34,9
Recuperación del producto 2	38,5	0,8	30,8
Recuperación del producto 3	38,5	0,8	30,8
Recuperación del producto 4	38,6	0,8	30,8
Recuperación del producto 5	38,6	0,8	30,9
Recuperación del producto 6	38,6	0,8	30,9

ES 2 825 062 T3

Recuperación del producto 7	38,6	0,8	30,9
Recuperación del producto 8	38,6	0,8	30,9
Recuperación del producto 9	38,6	0,8	30,9
Recuperación del producto 10	38,7	0,8	30,9
Recuperación del producto 11	38,7	0,8	30,9
Recuperación del producto 12	38,7	0,8	30,9

Productividad de la biomasa (g/L/día)	26,8
Contenido de EPA en la biomasa (%)	2,6
Productividad de la EPA (mg/L/h)	29,0

	Día 4		
	DCW (g/L)	Recuperación del producto (L)	Biomasa recogida (g)
Recuperación del producto 1	38,7	0,8	31,0
Recuperación del producto 2	38,7	0,8	31,0
Recuperación del producto 3	38,7	0,8	31,0
Recuperación del producto 4	38,8	0,8	31,0
Recuperación del producto 5	38,8	0,8	31,0
Recuperación del producto 6	38,8	0,8	31,1
Recuperación del producto 7	38,8	0,8	31,1
Recuperación del producto 8	38,9	0,8	31,1
Recuperación del producto 9	38,9	0,8	31,1
Recuperación del producto 10	38,9	0,8	31,1
Recuperación del producto 11	38,9	0,8	31,2
Recuperación del producto 12	39,0	0,8	31,2

Productividad de la biomasa (g/L/día)	26,6
Contenido de EPA en la biomasa (%)	2,5
Productividad de la EPA (mg/L/h)	27,7

	Día 5		
	DCW (g/L)	Recuperación del producto (L)	Biomasa recogida (g)
Recuperación del producto 1	39,0	0,8	31,2
Recuperación del producto 2	39,0	0,8	31,2
Recuperación del producto 3	39,0	0,8	31,2

ES 2 825 062 T3

Recuperación del producto 4	39,0	0,8	31,2
Recuperación del producto 5	39,1	0,8	31,3
Recuperación del producto 6	39,1	0,8	31,3
Recuperación del producto 7	39,1	0,8	31,3
Recuperación del producto 8	39,1	0,8	31,3
Recuperación del producto 9	39,1	0,8	31,3
Recuperación del producto 10	39,1	0,8	31,3
Recuperación del producto 11	39,2	0,8	31,3
Recuperación del producto 12	39,2	0,8	31,3

Productividad de la biomasa (g/L/día)	26,8
Contenido de EPA en la biomasa (%)	2,4
Productividad de la EPA (mg/L/h)	26,8

	Día 6		
	DCW (g/L)	Recuperación del producto (L)	Biomasa recogida (g)
Recuperación del producto 1	39,2	0,9	35,3
Recuperación del producto 2	39,0	0,8	31,2
Recuperación del producto 3	39,2	0,8	31,3
Recuperación del producto 4	39,3	0,8	31,5
Recuperación del producto 5	39,5	0,8	31,6
Recuperación del producto 6	39,6	0,8	31,7
Recuperación del producto 7	39,7	0,8	31,8
Recuperación del producto 8	39,9	0,8	31,9
Recuperación del producto 9	40,0	0,8	32,0
Recuperación del producto 10	40,2	0,8	32,1
Recuperación del producto 11	40,3	0,8	32,2
Recuperación del producto 12	40,5	0,8	32,4

Productividad de la biomasa (g/L/día)	27,5
Contenido de EPA en la biomasa (%)	2,3
Productividad de la EPA (mg/L/h)	26,4

ES 2 825 062 T3

	Día 7		
	DCW (g/L)	Recuperación del producto (L)	Biomasa recogida (g)
Recuperación del producto 1	40,6	0,85	34,5
Recuperación del producto 2	40,2	0,75	30,2
Recuperación del producto 3	40,1	0,75	30,1
Recuperación del producto 4	40,0	0,75	30,0
Recuperación del producto 5	39,9	0,75	29,9
Recuperación del producto 6	39,8	0,75	29,9
Recuperación del producto 7	39,7	0,75	29,8
Recuperación del producto 8	39,7	0,75	29,7
Recuperación del producto 9	39,6	0,75	29,7
Recuperación del producto 10	39,5	0,75	29,6
Recuperación del producto 11	39,4	0,75	29,5
Recuperación del producto 12	39,3	0,75	29,5

Productividad de la biomasa (g/L/día)	25,9
Contenido de EPA en la biomasa (%)	2,4
Productividad de la EPA (mg/L/h)	25,9

	Día 8		
	DCW (g/L)	Recuperación del producto (L)	Biomasa recogida (g)
Recuperación del producto 1	39,2	0,85	33,3
Recuperación del producto 2	39,1	0,75	29,3
Recuperación del producto 3	39,3	0,75	29,5
Recuperación del producto 4	39,5	0,75	29,6
Recuperación del producto 5	39,7	0,75	29,8
Recuperación del producto 6	39,9	0,75	29,9
Recuperación del producto 7	40,1	0,75	30,1
Recuperación del producto 8	40,3	0,75	30,3
Recuperación del producto 9	40,6	0,75	30,4
Recuperación del producto 10	40,8	0,75	30,6
Recuperación del producto 11	41,0	0,75	30,7
Recuperación del producto 12	41,2	0,75	30,9

Productividad de la biomasa (g/L/día)	26,0
Contenido de EPA en la biomasa (%)	2,5
Productividad de la EPA (mg/L/h)	27,1

Ejemplo 3

5 El cultivo del Ejemplo 2 se cambió de una recuperación del producto cada 2 horas a una recuperación del producto una vez cada 24 horas. En el momento de recuperar el producto, 7L (50%) del volumen del cultivo en el fermentador fue retirado de la fermentación en el transcurso de 70 minutos. Al finalizar la recuperación del producto, se inició la recarga del fermentador con aproximadamente 400 ml de medio recién preparado añadido de nuevo al fermentador cada hora hasta alcanzar un volumen total de 14L.

La provisión de medios recién preparados y silicatos se hizo como en los ejemplos anteriores.

10 Se tomó una muestra de 100 ml en el momento de recuperar el producto para determinar el peso y la composición de las células en seco del cultivo. Los pesos de las células en seco variaban entre 40,4 g/L en el día 1 y 44,6 g/L el día 5 y 43,9 g/L el día 6, lo que proporcionaba una productividad de la biomasa de entre 20,5 y 22,6 g/L/día. El contenido de EPA en la biomasa fue de entre el 2,5 y el 2,7% de peso celular en seco.

Ejemplo 4

15 El cultivo del Ejemplo 3 se cambió de recuperar el producto cada 24 horas a casi un cultivo continuo. Una vez que el cultivo hubo alcanzado un peso en seco de más de 40g/ L, 30 ml de medio se añadieron cada 5 minutos. También se añadió silicato como en el Ejemplo 1. Las recuperaciones del producto se llevaban a cabo según era necesario mantener el volumen de cultivo entre 14,0 y 14,2L. La inclusión del volumen adicional añadido como silicato, y el volumen tomado como muestras de aproximadamente 8,9L de medio fue añadido y recuperado al día.

20 Se tomaron muestras para determinar el peso y la composición de las células en seco del cultivo a las 9 h de la mañana de lunes a viernes. Las productividades de biomasa se calcularon en base a que un promedio entre dos mediciones de peso seco a las 9 a. m. era representativo de un período de 24 horas. Las productividades de biomasa se muestran en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3

Día	DCW a las 9 a.m. (g/L)	Promedio en seco del peso para el cálculo (g/L)	Volumen de recuperación del producto (L)	Producción de biomasa (g/L)	Contenido de EPA (%)	Productividad de EPA (mg/L/hora)
1	44,5	42,7	8,9	27,1	2,7	30,5
2	40,9	41,2	8,9	26,2	2,8	30,5
3		41,7	8,9	26,5	No medido	
4		42,2	8,9	26,8	No medido	
5	42,5	42,8	8,9	27,2	2,7	30,6
6	43,1	42,9	8,9	27,3	2,9	33,0
7	42,8	42,8	8,9	27,2	2,8	31,8

Ejemplo 5

30 El cultivo del Ejemplo 4 se mantuvo en cultivo continuo más allá del período de siete días del ejemplo. Después de ser restablecido con una recuperación del producto de 7,2L, se cambió a un régimen de recuperación del producto por hora de 4 horas en el que el volumen de cultivo activo retirado fue reemplazado con medio de cultivo recién preparado en una adición después de que la recuperación del producto fuera concluida. Esto continuó durante un mes más. Con la excepción del día 8 del cultivo, causado por el restablecimiento entre los Ejemplos 1 y 2, y el día 18 del cultivo, causado por el restablecimiento entre los Ejemplos 2 y 3, la productividad de la biomasa del cultivo medida de 9am a 9am no disminuyó por debajo de 20g/L/día durante un período de 60 días como se muestra en la

Figura 1 (téngase en cuenta que las productividades durante los fines de semana después del Ejemplo 4 se trazan como promedios para el fin de semana). En las últimas etapas del cultivo se observaron productividades de biomasa superiores a 35g/L/día. Con EPA en aproximadamente el 2,5% de la biomasa en ese momento, esto dio productividades de EPA de más de 35mg EPA/L/hora. El mismo medio fue usado en todo momento y los aumentos en la productividad se atribuyen a cambios en la agitación y la presión para mejorar la disponibilidad de oxígeno.

Además de producir EPA, el organismo produjo también ARA y DHA. Una composición típica de biomasa incluía DHA en aproximadamente 0,15% de biomasa y ARA en aproximadamente el 0,1% de la biomasa.

Ejemplo 6

Un cultivo de la cepa In1CS20 de *Nitzschia laevis* se hizo crecer en un cultivo de 500 L en un recipiente de 600L acoplado a una bomba. El pH se mantuvo a 8,0 o por encima mediante la adición de NaOH, la temperatura se mantuvo a 20°C, y la presión en torno a 500mbar por encima de la presión atmosférica. El flujo de aire se ajustó para mantener los niveles de oxígeno disueltos por encima del 30% de saturación en la parte inferior del recipiente.

Las células fueron cultivadas hasta una densidad de aproximadamente 40 g de peso celular en seco por litro de cultivo y después se inició la recuperación del producto. Cada 4 horas, 40 litros de cultivo eran retirados del recipiente como recuperación del producto y el volumen se completó de nuevo a 500 L con medio recién preparado. Esto se mantuvo durante 6 días. El día 4, el volumen operativo en el fermentador se redujo a 480 L debido a que el flujo de aire había subido hasta el punto en el que la altura de espuma en el fermentador ya se acercaba al plato superior. La recuperación del producto se redujo proporcionalmente a 38L cada 4 horas.

El medio recién preparado estaba compuesto por:

20		g/L
	Monohidrato de glucosa	120
	Nitrato de sodio NaNO_3	12,7
	Extracto de levadura	3,9
	Na_2HPO_4	1,47
25	Cloruro de sodio NaCl	7,5
	Cloruro de potasio KCl	1,04
	Sulfato de magnesio heptahidrato $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4,4
	Cloruro de calcio dihidrato $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,181
	Sulfato de sodio	0,521
30		mg/L
	Cloruro de cobalto hexahidrato $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,072
	Cloruro de manganeso 4-hidrato $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,750
	Ácido bórico H_3BO_3	91,643
35	Cloruro de zinc ZnCl_2	0,936
	Molibdato de sodio dihidrato $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,212
	Cloruro férrico hexahidrato	6,42
	Citrato	600,0
	Sulfato de cobre	0,022
40	Vitamina B12	180,2
	Tiamina	0,302
	Biotina	0,302

Además de las recargas de los medios, se proporcionó metasilicato de sodio al cultivo como una alimentación separada, casi continua, de tal manera que se proporcionaba en torno al 7,5% de metasilicato sódico (pentahidrato)/peso de células en seco.

- 5 El peso del cultivo de células en seco se midió en la primera recuperación del producto y se tomaron muestras en esos momentos para el análisis de la composición entre los días dos y seis. La productividad de la biomasa se calculó según el Ejemplo 1.

El cultivo de peso en seco (DCW), la productividad de la biomasa, el contenido de EPA y la productividad de EPA se muestran en la Tabla 4.

10 Tabla 4

	Día 1		
	DCW (g/L)	Recuperación del producto (L)	Biomasa recogida (g)
Recuperación del producto 1	46,6	40,0	1864,0
Recuperación del producto 2	46,6	40,0	1864,7
Recuperación del producto 3	46,6	40,0	1865,3
Recuperación del producto 4	46,6	40,0	1866,0
Recuperación del producto 5	46,7	40,0	1866,7
Recuperación del producto 6	46,7	40,0	1867,3

Productividad de la biomasa (g/L/día)	22,4
Contenido de EPA en la biomasa (%)	No medido
Productividad de la EPA (mg/L/h)	Desconocido

	Día 2		
	DCW (g/L)	Recuperación del producto (L)	Biomasa recogida (g)
Recuperación del producto 1	46,7	40,0	1868,0
Recuperación del producto 2	46,8	40,0	1871,3
Recuperación del producto 3	46,9	40,0	1874,6
Recuperación del producto 4	46,9	40,0	1878,0
Recuperación del producto 5	47,0	40,0	1881,3
Recuperación del producto 6	47,1	40,0	1884,7

Productividad de la biomasa (g/L/día)	22,5
Contenido de EPA en la biomasa (%)	2,3
Productividad de la EPA (mg/L/h)	21,6

ES 2 825 062 T3

	Día 3		
	DCW (g/L)	Recuperación del producto (L)	Biomasa recogida (g)
Recuperación del producto 1	47,2	40,0	1888,0
Recuperación del producto 2	47,6	40,0	1903,0
Recuperación del producto 3	48,0	40,0	1918,2
Recuperación del producto 4	48,3	40,0	1933,5
Recuperación del producto 5	48,7	40,0	1948,8
Recuperación del producto 6	49,1	40,0	1964,4

Productividad de la biomasa (g/L/día)	23,1
Contenido de EPA en la biomasa (%)	2,6
Productividad de la EPA (mg/L/h)	25,0

	Día 4		
	DCW (g/L)	Recuperación del producto (L)	Biomasa recogida (g)
Recuperación del producto 1	49,5	38,0	1881,0
Recuperación del producto 2	50,3	38,0	1909,7
Recuperación del producto 3	51,0	38,0	1938,7
Recuperación del producto 4	51,8	38,0	1968,3
Recuperación del producto 5	52,6	38,0	1998,3
Recuperación del producto 6	53,4	38,0	2028,7

Productividad de la biomasa (g/L/día)	24,4
Contenido de EPA en la biomasa (%)	2,5
Productividad de la EPA (mg/L/h)	25,4

	Día 5		
	DCW (g/L)	Recuperación del producto (L)	Biomasa Recogida (g)
Recuperación del producto 1	54,2	38,0	2059,6
Recuperación del producto 2	53,6	38,0	2037,5
Recuperación del producto 3	53,0	38,0	2015,6
Recuperación del producto 4	52,5	38,0	1994,0
Recuperación del producto 5	51,9	38,0	1972,5
Recuperación del producto 6	51,4	38,0	1951,4

Productividad de la biomasa (g/L/día)	25,1
Contenido de EPA en la biomasa (%)	2,2
Productividad de la EPA (mg/L/h)	23,0

	Día 6		
	DCW (g/L)	Recuperación del producto (L)	Biomasa Recogida (g)
Recuperación del producto 1	50,8	38,0	1930,4
Recuperación del producto 2	49,9	38,0	1896,0
Recuperación del producto 3	49,0	38,0	1862,1
Recuperación del producto 4	48,1	38,0	1828,9
Recuperación del producto 5	47,3	38,0	1796,3
Recuperación del producto 6	46,4	38,0	1764,3

Productividad de la biomasa (g/L/día)	23,1
Contenido de EPA en la biomasa (%)	2,2
Productividad de EPA (mg/L/h)	21,2

Ejemplo 7 - Instrucciones para un cultivo a mayor escala

- 5 Un cultivo de la cepa In1CS20 de *Nitzschia laevis* se cultiva en 70.000L de medio en un fermentador de tanque agitado de 80.000L. El pH se mantiene a 8,0 o más por la adición de KOH, la temperatura se mantiene a 20°C, y la presión en aproximadamente 300mbar por encima de la presión atmosférica. La agitación se ajusta para mantener los niveles de oxígeno disuelto por encima del 30% de saturación en el punto de 60.000L en el recipiente.
- 10 Las células se cultivan hasta una densidad de aproximadamente 40 g de peso de célula en seco por litro de cultivo y la recuperación del producto se inicia entonces. Cada 4 horas, aproximadamente 7000 litros de cultivo se retiran del recipiente como recuperación del producto utilizando la presión como fuerza motriz y el volumen se rellena de nuevo hasta 70.000L con medio recién preparado. Esto se mantiene durante 21 días y produce el equivalente a aproximadamente 35 toneladas de peso seco de biomasa de algas o 24 g/L/día durante el transcurso del período.
- 15 Además de las recargas de los medios, la solución de metasilicato de sodio se proporciona al cultivo como una alimentación separada, continua, de manera que se proporciona en torno al 7,5% de metasilicato sódico (pentahidrato)/peso de células en seco.

Ejemplo 8 - Determinación de los niveles de nutrientes (azufre) para apoyar el crecimiento en fase logarítmica de la diatomea

- 20 Se formuló un medio de crecimiento totalmente definido que carecía de azufre en el que todos los nutrientes, excepto el azufre, se suministraban en cantidades no limitantes a pH 8,0.
- Una serie de matraces Ehrlenmeyer de 250 ml estériles y duplicados se prepararon añadiendo 100 ml del medio sin azufre al que se habían añadido cantidades variables de sulfato de magnesio. La concentración superior de azufre fue elegida para representar un pequeño exceso esperado de las células con otras concentraciones que representaban el 40%, 30%, 20%, 10% y 0% de este nivel.
- 25 Los matraces fueron entonces inoculados con un bajo nivel de células de *Nitzschia laevis* de crecimiento exponencial (5 mg de peso en seco por matraz) para limitar el traspaso de azufre del cultivo anterior. Los matraces fueron colocados en un agitador orbital a 20°C para estimular el crecimiento.
- 30 Los pesos en seco del cultivo se determinaron entre los días 3 y 8 del cultivo. Aparte del cultivo sin azufre añadido, se observaron niveles similares de crecimiento hasta el día 4 del cultivo, momento en el cual las densidades celulares divergieron con aquellos cultivos que recibían más azufre creciendo a densidades más altas. (Véase la figura 2).

Al trazar el peso máximo de las células en seco frente a la provisión de azufre (Figura 3), se determinó que el inóculo proporcionaba suficiente azufre para permitir que la biomasa se acumulara a aproximadamente 1,5 g/L, aunque a partir de ahí aproximadamente un máximo de aproximadamente 98,5 mg de peso de células en seco podía producirse por mg de azufre. Esto permitió la determinación de la cantidad mínima de azufre necesaria para apoyar el crecimiento de la biomasa en una fermentación por lotes tradicional (10,1 mg S por g de peso de células en seco).

Sin embargo, de la Figura 2 se desprende claramente que los cultivos abandonan el crecimiento en la fase logarítmica antes de alcanzar el peso en seco máximo. Para calcular la cantidad de azufre necesaria para mantener las células en crecimiento en fase logarítmica, primero se calculó la verdadera cantidad de azufre en el cultivo utilizando la cantidad de biomasa acumulada en el cultivo de azufre cero y los requisitos de azufre por peso de células en seco. Luego, a través de la gráfica del peso de células en seco en el que los cultivos divergieron del crecimiento en fase logarítmica frente al contenido de azufre corregido del medio (Figura 4) se determinó que sólo 91,9 mg de peso celular en seco podía mantenerse en crecimiento en fase logarítmica por mg de azufre. Esto se traduce en 10,9 mg de azufre que se requieren por g de peso de células en seco para mantener el cultivo en fase logarítmica.

En cultivos con densidades de 45g de DCW/L esta diferencia de aproximadamente el 8% equivale a un requerimiento adicional de aproximadamente 36 mg/L de azufre o más de 600 mg por litro de sulfato de magnesio heptahidrato, demostrando así cómo la diferencia de enfoque es crítica en el diseño de los medios.

Con el fin de determinar un diseño de medios para apoyar el crecimiento en fase logarítmica, este experimento se llevó a cabo para cada uno de los nutrientes en el medio. Así, una vez leída la descripción de la presente aplicación se puede diseñar un medio siguiendo este ejemplo, para apoyar el crecimiento en fase logarítmica de una variedad de diatomeas en diferentes escalas de fermentación.

Ejemplo 9 - Instrucciones para el uso de *Cyclotella cryptica*

La diatomea, *Cyclotella cryptica* se cultiva heterotróficamente en un cultivo continuo en un fermentador de 14 L. La composición del medio es según Pahl et al. (J Bioscience and Bioengineering 109: 235-239 (2010) ajustada según los métodos del Ejemplo 8). El pH se mantiene entre 7,2 y 8,1 y la temperatura entre 23°C y 25°C. Se permite que el peso de células en seco del cultivo aumente a por lo menos 40 g de peso seco/L, momento en el cual se inicia un ciclo de 4 horas de 10% de recuperación del producto y recarga del cultivo. El silicato y el medio recién preparado se alimentan al cultivo como en el Ejemplo 1. Se espera que el contenido de EPA de la biomasa sea de al menos el 2% de peso celular en seco. El cultivo recuperado se concentra por centrifugación a por lo menos 150 g de peso en seco/L y se liofiliza. La biomasa liofilizada se extrae con etanol y los lípidos en el extracto de etanol se transesterifican para formar los FAEE. Los FAEE se concentran parcialmente mediante una destilación de trayecto corto (eliminación de compuestos de color) y luego los EPA-EE se purifican con al menos un 60% de pureza por destilación molecular.

Ejemplo 10 - Instrucciones para el uso de *Phaeodactylum tricornutum*

La diatomea *Phaeodactylum tricornutum* (un fotoautótrofo necesario) se transforma primero según el método de Apt et al. (patente de US N°. 7.939.710) para darle la capacidad de crecer heterotróficamente usando glucosa como una fuente de energía y carbono. El organismo transformado se cultiva heterotróficamente en un cultivo continuo en un fermentador de 14 L utilizando el medio de cultivo descrito por Apt (patente de US N°. 7.939.710) ajustado según los métodos del Ejemplo 8). El pH se establece inicialmente y se mantiene por encima de 8,0. La temperatura mantenida a 28°C y la agitación y la aireación se ajustan para mantener un nivel de oxígeno disuelto de al menos el 40% de la saturación de aire. Se permite que el peso de las células en seco del cultivo aumente a al menos 20 g del peso en seco/L, momento en el cual se inicia un ciclo de 4 horas de 10% de recuperación del producto y recarga del cultivo. El silicato y el medio recién preparado se alimentan al cultivo como en el Ejemplo 1. Se espera que el contenido de EPA de la biomasa sea de al menos un 2% en peso celular en seco. El cultivo recuperado se concentra por centrifugación a por lo menos 150 g de peso en seco/L y se liofiliza. La biomasa en seco liofilizada se extrae con etanol y los lípidos en el extracto de etanol se transesterifican para formar los FAEE. Los FAEE están parcialmente concentrados por una destilación de trayecto corto y luego la EPA-EE se purifica a al menos el 50% de pureza por destilación molecular.

El peso de células en seco de cultivo y el régimen de recuperación del producto se eligen para producir biomasa a una velocidad de al menos 20 g de peso en seco/L/día. Se eligen condiciones del medio para que la biomasa producida contenga EPA a un nivel superior al 2% de peso celular en seco.

REIVINDICACIONES

1. Un método de producción de una biomasa de diatomea a una tasa de producción volumétrica de biomasa de al menos 20 g de peso en seco/L/día, en el que la diatomea produce al menos un ácido graso altamente insaturado (HUFA), comprendiendo el método los pasos de cultivar heterotróficamente continuamente una diatomea en un medio de cultivo y retirar al menos el 50% del volumen total del cultivo cada 24 horas y sustituirlo por un medio recién preparado, donde el medio de cultivo está diseñado para proporcionar los nutrientes esenciales para mantener la diatomea en un crecimiento en fase logarítmica y donde una fuente de silicato se añade continuamente durante el curso del cultivo.
2. El método de la reivindicación 1, en el que se selecciona al menos un ácido graso altamente insaturado (HUFA) de uno cualquiera de EPA, DHA y ARA o más de uno.
3. El método de la reivindicación 2, en el que la biomasa de diatomeas contiene una mezcla de EPA y DHA a un nivel de al menos un 2 % de peso de células en seco de la biomasa.
4. El método de la reivindicación 2, en el que la biomasa de diatomeas contiene EPA a un nivel de al menos el 2% de peso de células en seco de la biomasa.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la diatomea se selecciona de cualquiera de una especie de *Nitzschia*, una especie *Cyclotella*, una especie *Phaeodactylum*.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el método incluye la sustitución de al menos el 10% del volumen de cultivo por medio recién preparado cada 4 horas.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el método incluye la sustitución de al menos el 5% del volumen de cultivo por medio recién preparado cada 2 horas.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el método incluye la sustitución de al menos el 0,2% del volumen de cultivo por medio recién preparado cada 5 min.
9. Un método de producción de una composición de un ácido graso altamente insaturado (HUFA) o su éster, cuyo método incluye el paso de extraer el HUFA o su éster de la biomasa producida por alguno de los métodos de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

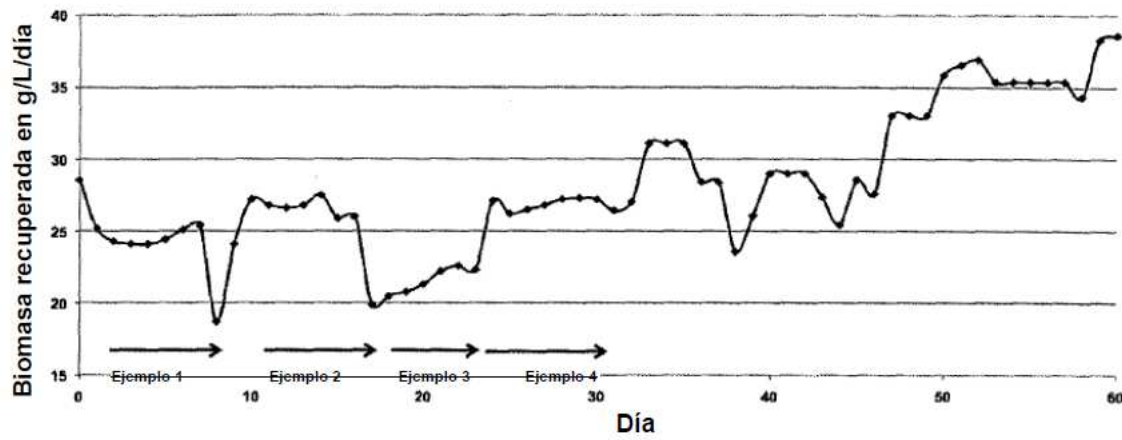


FIGURA 1

Crecimiento celular a diferentes concentraciones de azufre

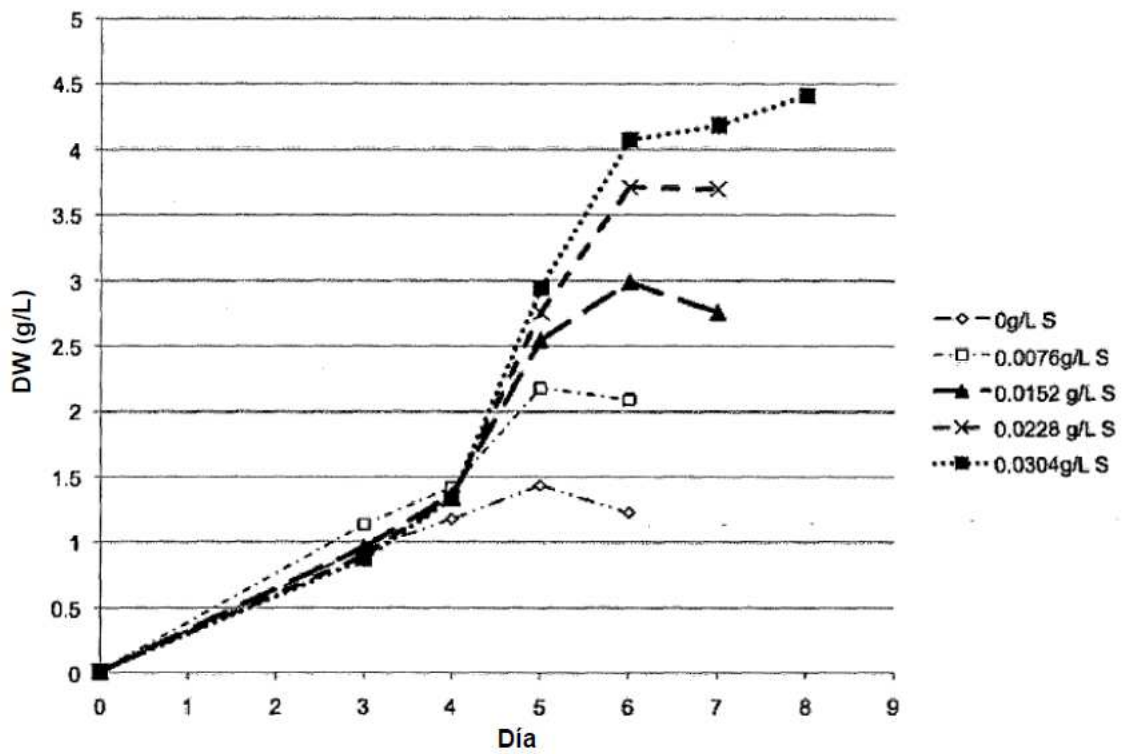


FIGURA 2

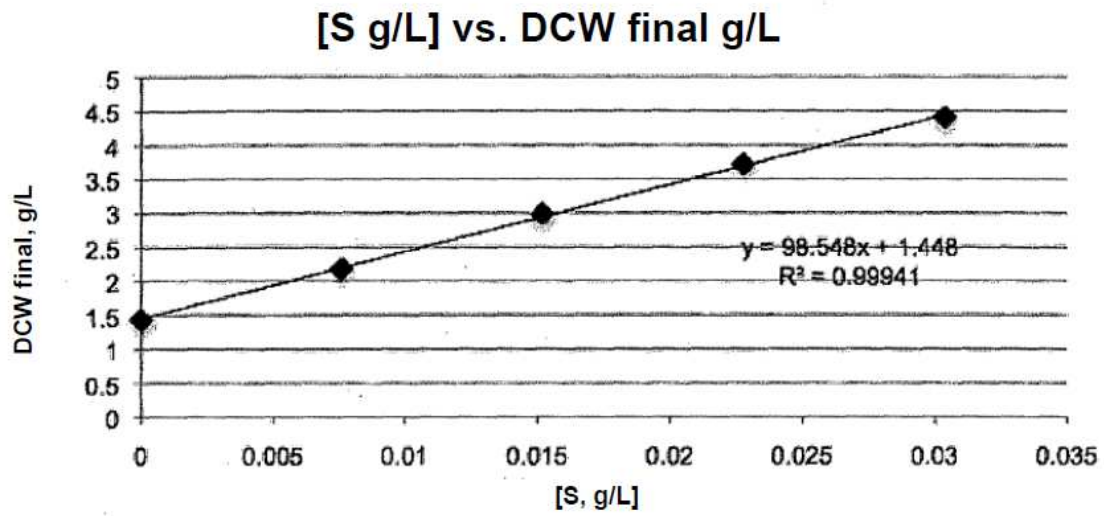


FIGURA 3

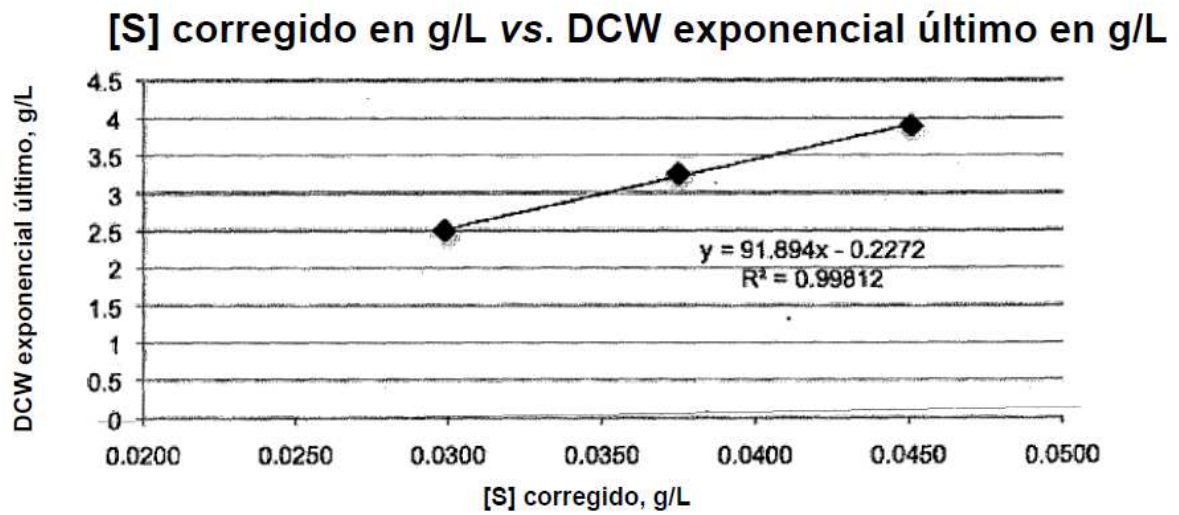


FIGURA 4