



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-301024-00000-0000

Fecha: 2013-12-27 12:24:21
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 8

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. 13-301024

54. TÍTULO COMPOSICIONES DE LIPIDOS
ALGALES Y MÉTODOS PARA PREPARARLAS
Y UTILIZARLAS.

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE AUTECH INC.

DOMICILIO KENTUCKY, ESTADOS UNIDOS.

74. APODERADO ALVARO CORREA

22. BOGOTÁ, D.C., _____



No. 13-301024- 00000-0000

Fecha: 2013-12-27 12:24:21 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 8

de radicación

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/US2012/046696	Fecha 13/07/2012
Publicación Internacional No.		WO/2013/010090	Fecha 17/01/2013
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)		
COMPOSICIONES DE LÍPIDOS ALGALES Y MÉTODOS PARA PREPARARLAS Y UTILIZARLAS			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
C12M 1/02 (2006.01), C12N 1/12 (2006.01), C12M 1/08 (2006.01), C12P 7/64 (2006.01)			
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor: Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN TIPO
1. ALLTECH, INC.			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN		3031 Catnip Hill Pike Nicholasville, Kentucky 40356	No. TELÉFONO 6341500
CIUDAD		Nicholasville	CORREO ELECTRÓNICO Alvaro.correa@bakermckenzie.com
DEPARTAMENTO/ESTADO		Kentucky	NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN Estados Unidos de América
PAÍS DE RESIDENCIA		Estados Unidos de América	
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. RANEY		Kyle, A.	Estados Unidos de América
2. TIMMONS,		Rebecca, A.	Estados Unidos de América
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1. Estados Unidos de América	Kentucky	Winchester	115 Hibiscus Lane Winchester, Kentucky 40391
2. Estados Unidos de América	Kentucky	Lexington	1830 McDonald Avenue Lexington, Kentucky 40503
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
Correa		Alvaro	C.C. 79.143.366 T.P. 20.281
DIRECCIÓN		No. TELÉFONO 6341500	
Av. 82 No. 10-62 Piso 5			
CIUDAD		CORREO ELECTRÓNICO Alvaro.correa@bakermckenzie.com	
Bogotá			
PAÍS		No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL	
Colombia			

10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
(33) PAÍS DE ORIGEN	CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
1. Estados Unidos de América	US	61/507,390	13/07/2011

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i> ☐ SI ☒ NO Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.	

12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i> ☐ SI ☒ NO Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.	

13	REDUCCIÓN DE TASAS
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i> ☐ SI ☒ NO Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.	
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐ Universidades públicas o privadas ☐ Entidades sin ánimo de lucro ☐	
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos	

14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☒ SI ☐ NO
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.	

15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N° 13-127323	Fecha 10/12/2013
		N° 13-134117	Fecha 26/12/2013

16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL
<i>Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)</i>	

17	ANEXOS
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano 1. ☒ Descripción N° de folios: 2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 32 3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: 21 4. ☒ Resumen. 5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso. 6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso. 7. ☐ Arte final 12 x 12. 8. ☒ Anexo formato digital. Documentación Jurídica 9. ☒ Poderes, si fuera el caso. 10. ☒ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante. 11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso. 12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso. 13. Reducción de tasas Micro, pequeñas o medianas empresas ☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004. Universidades públicas o privadas ☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación Entidades sin ánimo de lucro ☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☐ Hoja de información complementaria. ☐ Otros, especificar 14. ☐ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. 15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. 16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación. 17. ☐ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.	



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT

(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl:	
22) Fecha de solicitud:		(71)Solicitante(s) ALLTECH, INC.	
(30) Prioridad	(31) No. 61/507,390	32) Fecha 13/07/2011	(33) País US
		(72) Inventor(es) RANEY, Kyle, A.; TIMMONS, Rebecca, A.	
		(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ	
(85)	Fecha limite inicio fase nacional: 13/02/2014		(87) Publicación internacional
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 17/01/2013
	Fecha de presentación de la solicitud: 13/07/2012		N° publicación: WO/2013/010090
	No. de solicitud PCT/US2012/046696		
(54) Titulo: COMPOSICIONES DE LÍPIDOS ALGALES Y MÉTODOS PARA PREPARARLAS Y UTILIZARLAS			

Resumen:

La presente invención se relaciona con composiciones que comprenden algas con un alto contenido de lípidos y métodos para hacer y utilizar las mismas. En 5 particular, la invención se relaciona con biomasa de algas con un alto contenido de lípidos y materiales algales de lípidos derivados de las mismas, métodos para hacer las mismas, así como biocombustibles (por ejemplo, biodiesel) y una composición dietética (por ejemplo, comida para animales) 10 que comprenden o están hechas de las mismas. Las composiciones y métodos de la invención encuentran su uso en una variedad de aplicaciones incluyendo de biocombustibles, dietéticas (por ejemplo, nutrición humana y animal), terapéuticas así como aplicaciones en investigación.

4

**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**DIVISION DE NUEVAS CREACIONES****TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS**PATENTE DE INVENCION ____ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud:

(51) Clasificación Internacional :

(71) Solicitante(s)

ALLTECH, INC.

(72) Inventor(es)

RANEY, Kyle, A.; TIMMONS, Rebecca, A.

(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

(30) Prioridad

(31) *No. Prioridad*

32)

Fecha(33) *País*

61/507,390

13/07/2011

US

(85) Fecha inicio fase nacional: **13/02/2014**

(87) Publicación internacional

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha: **17/01/2013**Fecha de presentación de la solicitud: **13/07/2012**N° publicación: **WO/2013/010090**No. de solicitud **PCT/US2012/046696**

(54) Título:

COMPOSICIONES DE LÍPIDOS ALGALES Y MÉTODOS PARA PREPARARLAS Y UTILIZARLAS



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO TEMATICO

PATENTE DE INVENCION ____ PCT X MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____

(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud:

(51) Clasificación Internacional :

(71) Solicitante(s)

ALLTECH, INC.

(72) Inventor(es)

RANEY, Kyle, A.; TIMMONS, Rebecca, A.

(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDÓÑEZ

(30) Prioridad

(31) **No. Prioridad**

(32)

Fecha

(33) **País**

61/507,390

13/07/2011

US

(85) Fecha límite inicio fase nacional: **13/02/2014**

(86) Datos relativos a la presentación de la solíc.
PCT

Fecha de presentación de la solicitud:

13/07/2012

No. de solicitud **PCT/US2012/046696**

(87) Publicación internacional:

Fecha: **17/01/2013**

No. Publicación : **WO/2013/010090**

(54) Titulo:

COMPOSICIONES DE LÍPIDOS ALGALES Y MÉTODOS PARA PREPARARLAS Y UTILIZARLAS

(57) Resumen:

La presente invención se relaciona con composiciones que comprenden algas con un alto contenido de lípidos y métodos para hacer y utilizar las mismas. En 5 particular, la invención se relaciona con biomasa de algas con un alto contenido de lípidos y materiales algales de lípidos derivados de las mismas, métodos para hacer las mismas, así como biocombustibles (por ejemplo, biodiesel) y una composición dietética (por ejemplo, comida para animales) 10 que comprenden o están hechas de las mismas. Las composiciones y métodos de la invención encuentran su uso en una variedad de aplicaciones incluyendo de biocombustibles, dietéticas (por ejemplo, nutrición humana y animal), terapéuticas así como aplicaciones en investigación.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 127323

Bogotá D.C., Diciembre 10 de 2013 - 13:40:40

RECIBIDO DE : BAKER

NI 900.532.339

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	213782925	10/12/2013	140.225.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00	500.000.00
				\$500.000.00

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-301024-00000-0000

Fecha: 2013-12-27 12:24:21

Tra. 11 PATENTEIYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Eve: 378 FASENACIONALI

Folios: 8

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Diciembre 10 de 2013 - 13:40:57

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 134117

Bogotá D.C., Diciembre 26 de 2013 - 16:27:08

RECIBIDO DE : BAKER

NI 900.532.339

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	134116	26/12/2013		660.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
22 50005-01-01	SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	660.000.00
				\$660.000.00

SON: **SEISCIENTOS SESENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-301024- -00000-0000

Fecha: 2013-12-27 12:24:21 Dep. 2020 DIR.NUEVASOR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 8

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

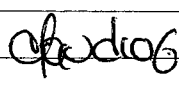
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Diciembre 26 de 2013 - 16:27:08

		PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA RELACIÓN DE ANEXOS	
Dependencia: 2020		Fecha: <u>2013</u> / <u>12</u> / <u>23</u> AAAA MM DD	
		Recorrido:	
Tipo de Radicación: Entrada: ☐ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐			
Radicador:			Planilla:

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	13-301024	0	
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	Soporte Documental
7	CD X
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
16	Otro

Observaciones: Anexos cd 

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Descripción de la invención
 - ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☐ Indicación que se solicita una PCT
 - ☐ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
 - ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-301024- -00000-0000

Fecha: 2013-12-27 12:24:21 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 8

PI02-F08 (2009-11-18)

ASSIGNMENT

**RANEY, Kyle, A.
TIMMONS, Rebecca, A.**

by means of this document assign(s) to

ALLTECH, INC.

A company organized under the laws of

United States of America

Domiciled in

**3031 Catnip Hill Pike Nicholasville, Kentucky
40356, United States of America**

all my (our) rights, title and interest in and to my (our)
invention entitled and as fully set forth and described in:

**ALGAL LIPID COMPOSITIONS AND METHODS
OF PREPARING AND UTILIZING THE SAME**

So far as the Republic of Colombia is concerned and any
other country in which the application is filed.

Done and subscribed in **Nicholasville, KY USA**

On the 2 day of Dec of 2013



Signature of the inventors



Signature of the inventors

CESION

**RANEY, Kyle, A.
TIMMONS, Rebecca, A.**

por medio de la presente cedo (cedemos) a

ALLTECH, INC.

Una compañía organizada bajo las leyes de

Estados Unidos de América

domiciliada en

**3031 Catnip Hill Pike Nicholasville, Kentucky
40356, Estados Unidos de América**

todos mis (nuestros) derechos, título e interés sobre mi
(nuestra) invención titulada y tal como describe en:

(Nombre de la invención)

en lo que concierne a la República de Colombia y cualquier
otro país del mundo en donde se presente la solicitud.

Dado y firmado en

A los 2 días del mes de Dec de 2013



Firma de los inventores



Firma de los inventores

The State of Wisconsin

Office of the
Secretary of State

APOSTILLE

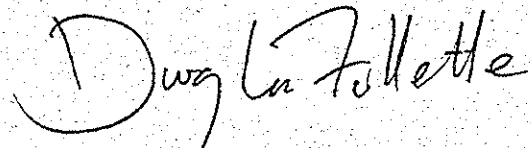
(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America
2. This public document has been signed by Vickie Hoeft
3. acting in the capacity of Notary Public, State of Wisconsin
4. bears the seal/stamp of Notary Public, State of Wisconsin.

CERTIFIED for Colombia

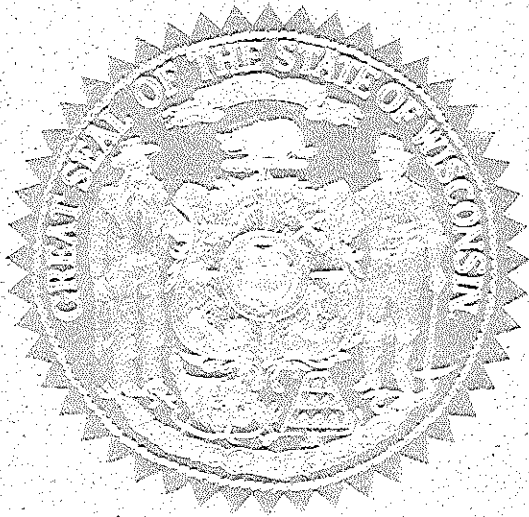
5. at Madison, Wisconsin
6. August 15, 2011
7. by the Secretary of State of Wisconsin
8. No. 210603
9. Seal/stamp:

10. Signature



DOUGLAS LA FOLLETTE
Secretary of State

This certificate only confirms the authority of the person named in Number 2. It does not mean that the contents of the attached document are correct, or that the Secretary of State approves of the contents.



NOTARIAL CERTIFICATE

(True Copy)



STATE OF WISCONSIN)
) SS
COUNTY OF DANE)

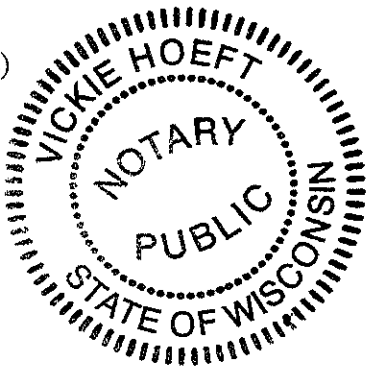
I, Vickie Hoeft, a Notary Public in and for the State of Wisconsin, duly appointed, certify that the instrument annexed is a true copy of the document produced and shown to me and being a Power of Attorney from ALLTECH, Inc., 3031 Catnip Hill Pike Nicholasville, KY 40356, USA. Executed by Nathan Hunter Hohman, appointing Baker & McKenzie as agent, dated July 20, 2011, the original of which I have examined.

Dated at Madison, Wisconsin, this 11th day of August 2011.

Handwritten signature of Vickie Hoeft in cursive script, underlined.

Notary Public State of Wisconsin
My Commission Expires: March 24, 2013

(SEAL)



POWER OF ATTORNEY

The undersigned.

ALLTECH, INC.

located at

3031 Catnip Hill Pike Nicholasville, Kentucky 40356,
United States of America

declares that it hereby grants to

**ÁLVARO CORREA-ORDÓÑEZ and/or
RICARDO METKE MENDEZ and/or JUAN PABLO
CONCHA-DELGADO and/or
OLGA GEORGETTE OTERO**

of the firm Baker & McKenzie Colombia S.A members of
Baker & McKenzie, domiciled at Av. 82 No. 10-62, 6th floor, of
Bogotá D.C., Colombia, full and sufficient power of attorney to
pursue before the competent authorities the following matters:

Trademark registrations and renewals; deposit and
registration of commercial names and commercial ensigns;
registration and renewal of domain names; Prosecution and
obtainment of patents, utility models, industrial designs,
integrated circuits layout-designs and vegetal varieties;
recordals of mergers, changes of name, assignments,
changes of domicile and address; security interests; liens
and other acts that affect or limit the mentioned industrial
property rights; filing and prosecution of oppositions;
recordal of license of use agreements; filing and prosecution
of cancellation actions, annulment actions, annulment and
reinstatement of right action, and all judicial actions
available for the prosecution of proceedings related to
intellectual property matters, unfair competition, and
protection of consumers.

to which end it empowers them to file requests, petitions and
lawsuits, appeals and objections, pay taxes, receive, including
faculties to enter into settlement agreements, conciliations and
transactions, abandon applications and renounce rights and, in
general, to take all the actions before the competent authorities
in order to duly protect our intellectual property. To the said
mandatories sufficient power is granted hereby to receive
notifications for and on behalf of the Company, to confer
powers on those who are to represent the Company judicially
and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims
and demands that may be presented in connection with the
marks and other intellectual property rights, and to do
everything that may be required before administrative or
judicial officers of any class to comply this power, giving them
likewise faculty to substitute these presents and revoke such
substitutions if necessary.

Done and subscribed in Nicholasville, Kentucky, USA

On the 20 day of July of 2011


Nathan Hunter Hohman
Secretary and Treasurer, Alltech, Inc.
Signature of the person Issuing the Power

PODER

La abajo firmada,

ALLTECH, INC.

domiciliada en

3031 Catnip Hill Pike Nicholasville, Kentucky 40356, Estados
Unidos de América

declara por el presente que otorga a

**ÁLVARO CORREA-ORDÓÑEZ y/o RICARDO METKE
MÉNDEZ y/o JUAN PABLO CONCHA-DELGADO y/o OLGA
GEORGETTE OTERO**

de la firma Baker & McKenzie Colombia S.A., miembros de Baker &
McKenzie, domiciliada en la Av. 82 No. 10-62 Piso 6 en Bogotá D.C.,
Colombia, poder especial amplio y suficiente, para adelantar ante las
autoridades competentes los siguientes asuntos:

Registro y renovación de marcas; depósito y registro de nombres
comerciales y enseñas comerciales; registro y renovación de
nombres de dominio; trámite y obtención de solicitudes de patentes
de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, esquemas
de trazado de circuitos integrados y variedades vegetales;
inscripción de fusiones, cambios de nombre, trasposos, cambios de
domicilio y de dirección; inscripción de contratos de prenda,
embargos y otros actos que afecten o limiten los mencionados
derechos de propiedad industrial; presentación y tramitación de
oposiciones; inscripción de licencias de uso; presentación y
tramitación de acciones de cancelación; acciones de nulidad,
acciones de nulidad y restablecimiento del derecho y demás
acciones judiciales, relacionadas con procesos de propiedad
industrial, competencia desleal y protección al consumidor.

a cuyo efecto los faculta para presentar solicitudes, peticiones y
demandas, interponer recursos, reclamos, pagar impuestos y tasas,
recibir, transigir y desistir, incluyendo facultades para entrar en
acuerdos amigables, conciliaciones y transacciones, abandonar
solicitudes y renunciar a derechos, y en general, a dar ante las
autoridades competentes todos los pasos necesarios para la debida
protección de nuestra propiedad industrial. Asimismo se concede a los
expresados mandatarios poder suficiente para recibir notificaciones a
nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar
a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas
las reclamaciones o demandas que por motivo de marcas y otros
derechos de propiedad industrial se presentaren y hacer cuanto fuere
necesario ante las autoridades administrativas o judiciales de cualquier
orden para el cumplimiento de este mandato, dándoles igualmente
facultad para sustituir el presente poder y en caso necesario, revocar
dichas sustituciones.

Dado y firmado en

A los días del mes de de 20


Firma de la persona que firma el Poder

The State of Wisconsin

Office of the
Secretary of State



APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America
2. This public document has been signed by Vickie Hoeft
3. acting in the capacity of Notary Public, State of Wisconsin
4. bears the seal/stamp of Notary Public, State of Wisconsin.

CERTIFIED for Colombia

5. at Madison, Wisconsin
6. August 22, 2011
7. by the Secretary of State of Wisconsin
8. No. 210863
9. Seal/stamp:



10. Signature

Douglas La Follette

DOUGLAS LA FOLLETTE
Secretary of State

This certificate only confirms the authority of the person named in Number 2. It does not mean that the contents of the attached document are correct, or that the Secretary of State approves of the contents.



NOTARIAL CERTIFICATE

(True Copy)

STATE OF WISCONSIN)
) SS
COUNTY OF DANE)

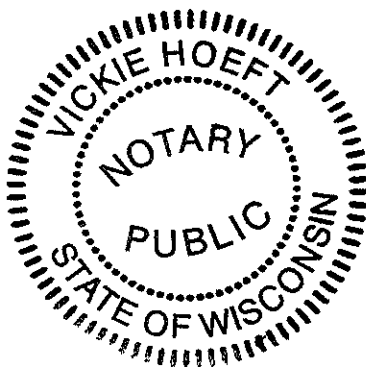
I, Vickie Hoeft, a Notary Public in and for the State of Wisconsin, duly appointed, certify that the instrument annexed is a true copy of the document produced and shown to me and being a Certificate of Existence for ALLTECH, Inc., 3031 Catnip Hill Pike Nicholasville, KY 40356, USA, the original of which I have examined.

Dated at Madison, Wisconsin, this 18th day of August 2011.

A handwritten signature in cursive script that reads "Vickie Hoeft".

Notary Public State of Wisconsin
My Commission Expires: March 24, 2013

(SEAL)



Commonwealth of Kentucky
Elaine N. Walker, Secretary of State

8/4/2011

Division of Corporations
Business Filings
P. O. Box 718
Frankfort, KY 40602
(502) 564-3490
<http://www.sos.ky.gov>

Certificate of Existence

Authentication Number: 116510

Visit <https://app.sos.ky.gov/ftshow/certvalidate.aspx> to authenticate this certificate.

I, Elaine N. Walker, Secretary of State of the Commonwealth of Kentucky, do hereby certify that according to the records in the Office of the Secretary of State,

ALLTECH, INC.

is a corporation duly incorporated and existing under KRS Chapter 271B, whose date of incorporation is August 7, 1980 and whose period of duration is perpetual.

I further certify that all fees and penalties owed to the Secretary of State have been paid; that articles of dissolution have not been filed; and that the most recent annual report required by KRS 271B.16-220 has been delivered to the Secretary of State.

IN WITNESS WHEREOF, I have hereunto set my hand and affixed my Official Seal at Frankfort, Kentucky, this 4th day of August, 2011.



Elaine N. Walker

Elaine N. Walker
Secretary of State
Commonwealth of Kentucky
116510/0148768

The State of Wisconsin



Office of the
Secretary of State

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America
2. This public document has been signed by Vickie Hoeft
3. acting in the capacity of Notary Public, State of Wisconsin
4. bears the seal/stamp of Notary Public, State of Wisconsin.

CERTIFIED for Colombia

5. at Madison, Wisconsin
6. August 22, 2011
7. by the Secretary of State of Wisconsin
8. No. 210864
9. Seal/stamp:

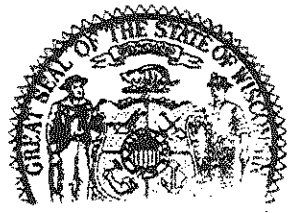
10. Signature

A handwritten signature in dark ink, reading "Douglas La Follette", is written over a horizontal line.

DOUGLAS LA FOLLETTE
Secretary of State

This certificate only confirms the authority of the person named in Number 2. It does not mean that the contents of the attached document are correct, or that the Secretary of State approves of the contents.





NOTARIAL CERTIFICATE

(True Copy)

STATE OF WISCONSIN)
) SS
COUNTY OF DANE)

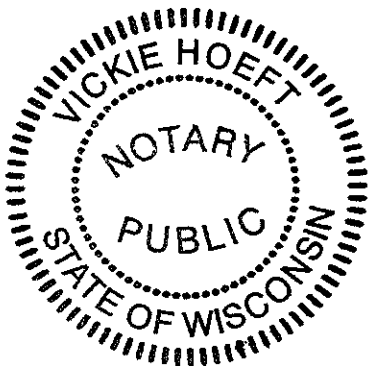
I, Vickie Hoeft, a Notary Public in and for the State of Wisconsin, duly appointed, certify that the instrument annexed is a true copy of the document produced and shown to me and being a Certificate of Incorporation and Annual Report from ALLTECH, Inc., 3031 Catnip Hill Pike Nicholasville, KY 40356, USA, the originals of which I have examined.

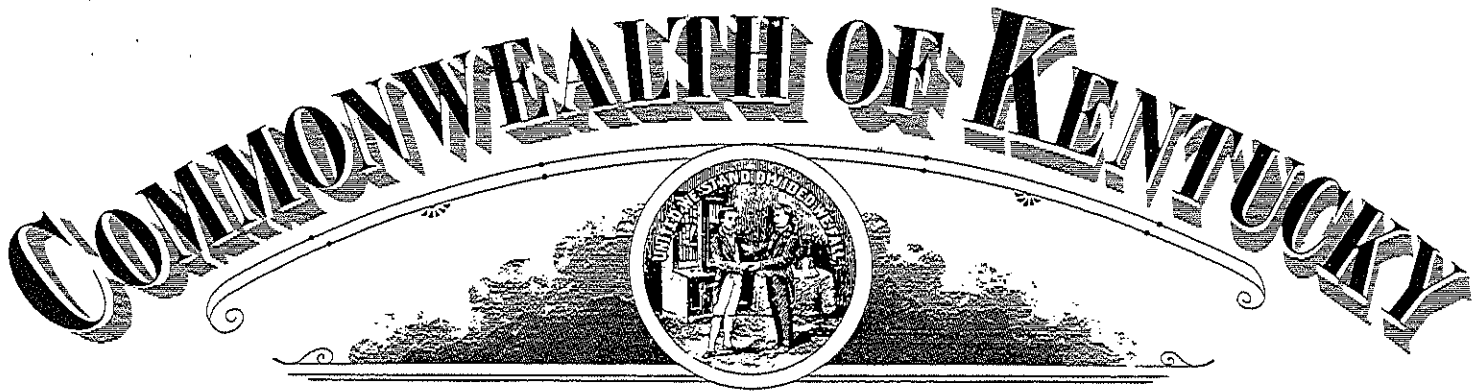
Dated at Madison, Wisconsin, this 18th day of August 2011.

A handwritten signature in cursive script, reading "Vickie Hoeft", written over a horizontal line.

Notary Public State of Wisconsin
My Commission Expires: March 24, 2013

(SEAL)





Elaine N. Walker
Secretary of State

Certificate

I, Elaine N. Walker, Secretary of State for the Commonwealth of Kentucky, do hereby certify that the foregoing writing has been carefully compared by me with the original thereof, now in my official custody as Secretary of State and remaining on file in my office, and found to be a true and correct copy of

CERTIFICATE OF INCORPORATION OF

ALLTECH, INC. FILED AUGUST 7, 1980;

2011 ANNUAL REPORT FILED MARCH 1, 2011.

IN WITNESS WHEREOF, I have hereunto set my hand and affixed my Official Seal at Frankfort, Kentucky, this 4th day of August, 2011.



Elaine N. Walker

Elaine N. Walker
Secretary of State
Commonwealth of Kentucky
dwilliams/0148768 - Certificate ID: 116511

Commonwealth of Kentucky

OFFICE OF
SECRETARY OF STATE

FRANCES JONES MILLS
Secretary



FRANKFORT,
KENTUCKY

CERTIFICATE OF INCORPORATION

I, **FRANCES JONES MILLS**, Secretary of State of the Commonwealth of Kentucky, do hereby certify that Articles of Incorporation of

ALITECH, INC.

whose initial agent for process is THOMAS PEARSE LYONS

LANE ALLEN PLAZA, 845 LANE ALLEN ROAD

and whose address is LEXINGTON, KENTUCKY

duly signed according to law, have been filed in my office. I further certify that all taxes, fees and charges payable upon the filing of said Articles of Incorporation have been paid.



SECRETARY OF STATE

Given under my hand and seal of Office as Secretary of State, at Frankfort, Kentucky, this 7TH day of AUGUST, 1980.

Frances Jones Mills
SECRETARY OF STATE

ASSISTANT SECRETARY OF STATE

ORIGINAL COPY FILED
SECRETARY OF STATE OF KENTUCKY
FRANKFORT, KENTUCKY

AUG 6 1980

Thomas Pearce Lyons
SECRETARY OF STATE

ARTICLES OF INCORPORATION
OF
ALLTECH, INC.

SECRETARY OF STATE
RECEIVED

AUG 7 1980

CH \$25
COMMONWEALTH OF KENTUCKY

The undersigned, Thomas Pearce Lyons, of Lexington, Kentucky, hereby forms a corporation under the laws of the Commonwealth of Kentucky.

ARTICLE I.

The name of the corporation shall be Alltech, Inc.

179945

ARTICLE II.

The corporation shall continue perpetually, unless sooner dissolved according to the laws of the Commonwealth of Kentucky.

ARTICLE III.

The purpose of the corporation is to produce biochemicals for the food industry and to act as consultants therewith. In addition to the foregoing, the purposes of the corporation shall include the transaction of any and all lawful business for which corporations may be incorporated under the laws of the Commonwealth of Kentucky.

ARTICLE IV.

The total authorized number of shares of stock of this corporation is two thousand (2,000), the shares to be without par value, and the holder of each share of stock shall be entitled to one (1) vote for each share held.

ARTICLE V.

The initial registered office of the corporation is: Lane Allen Plaza, 845 Lane Allen Road, Lexington, Kentucky 40504. The initial registered agent of the corporation at the above address is: Thomas Pearce Lyons.

ARTICLE VI.

The initial Board of Directors shall consist of one (1) person who shall be: Thomas Pearce Lyons, 3529 Cornwall Drive, Lexington, Kentucky 40503. The director shall continue to serve until his successor has been elected and qualified. The subsequent organization of the Board of Directors, including the number of directors, shall be governed by the

Commonwealth of Kentucky
Elaine N. Walker, Secretary of State

PARP
0148768
Elaine N. Walker
Secretary of State
Received and Filed
3/1/2011 4:08:15 PM
Fee receipt: \$15.00

Elaine N. Walker
Secretary of State
P. O. Box 1150
Frankfort, KY 40602-1150
(502) 564-3490
<http://www.sos.ky.gov>

Annual Report
Online Filing

ARP

Company: ALLTECH, INC.
Company ID: 0148768
State of origin: Kentucky
Formation date: 8/7/1980 12:00:00 AM
Date filed: 3/1/2011 4:08:15 PM
Fee: \$15.00

Principal Office

3031 CATNIP HILL
NICHOLASVILLE, KY 40356

Registered Agent Name/Address

NATIONAL REGISTERED AGENTS, INC
400 WEST MARKET STREET SUITE 1800
LOUISVILLE, KY 40202

Current Officers

President	Thomas Pearse Lyons	3031 Catnip Hill Pike, Nicholasville, KY 40356
Secretary	Nathan H Hohman	3031 Catnip Hill Pike, Nicholasville, KY 40356
Treasurer	Nathan H Hohman	3031 Catnip Hill Pike, Nicholasville, KY 40356
Vice President	Mark Pearse Lyons	3031 Catnip Hill Pike, Nicholasville, KY 40356

Directors

Director	Thomas Pearse Lyons	3031 Catnip Hill Pike, Nicholasville, KY 40356
Director	Nathan H Hohman	3031 Catnip Hill Pike, Nicholasville, KY 40356

Signatures

Signature	Nathan Hohman
Title	Secretary/Treasurer

1/5

Oficina del Secretario de estado

Sello redondo, certificado

APOSTILLA

(Convención De La Haya del 5 octubre de 1961)

1. País Estados Unidos de América
2. Este documento Público ha sido firmado por Vickie Hoeft
3. Quien ejerce funciones de notario público estado de Wisconsin
4. Lleva el sello notario público del estado de Wisconsin

CERTIFICADO

5. En Madison , Wisconsin 6. El 15 de agosto de 2011.
7. Por el secretario de estado- estado de Wisconsin
- 8 No. 210603 9. Sello del estado de Wisconsin
10. Firma ilegible Douglas Lafollette secretario de estado

La apostilla solo certifica la autoridad de la persona que firma en el n. 2. no significa que el contenido del documento es correcto o que el secretario apruebe el contenido. -

CERTIFICADO NOTARIAL:

(Copia verdadera)

Estado de Wisconsin

Condado de Dane) ss

Yo, Vickie Hoeft Notario público en y para el estado de Wisconsin, debidamente nombrada, certifico que el documento anexo es una copia verdadera del documento que me presentaron y es un Poder de ALLTECH, INC. con oficinas en 3031 Catnip Hill Pike Nicholasville KY 40356, Estados Unidos, suscrito por Nathan Hunter Hohman, nombrando a Baker & McKenzie como agente, fechado el 20 de julio de 2011, cuyo original examiné

Fechado en Madison, Wisconsin, el 11 de agosto de 2011.

Firma ilegible de Vickie Hoeft notario del Estado de Wisconsin.

Sello oficial. Notario público, Su comisión vence el 24-03 - 2011- .

PODER

En inglés y español de ALLTECH, INC, firmado en Nicholasville, Kentucky Estados Unidos, el 20 julio de 2011. firmado por Nathan Hunter Hohman secretario y tesorero

De Alltech, Inc. : Estado de Wisconsin.

Oficina del Secretario de estado

Sello redondo, certificado

APOSTILLA

(Convención De La Haya del 5 octubre de 1961)

1. País Estados Unidos de América
2. Este documento Público ha sido firmado por Vickie Hoeft
3. Quien ejerce funciones de notario público estado de Wisconsin
4. Lleva el sello notario público del estado de Wisconsin

CERTIFICADO

5. En Madison , Wisconsin 6. El 22 de agosto de 2011.
7. Por el secretario de estado- estado de Wisconsin
- 8 No. 210603 9. Sello del estado de Wisconsin
10. Firma ilegible Douglas Lafollette secretario de estado

Marlén Neira
MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

La apostilla solo certifica la autoridad de la persona que firma en el n. 2. no significa que el contenido del documento es correcto o que el secretario apruebe el contenido. -

2/5

CERTIFICADO NOTARIAL:

(Copia verdadera)

Estado de Wisconsin

Condado de Dane) ss

Yo, Vickie Hoeft Notario público en y para el estado de Wisconsin, debidamente nombrada, certifico que el documento anexo es una copia verdadera del documento que me presentaron y es un Certificado de Existencia de ALLTECH, INC. con oficinas en 3031 Catnip Hill Pike NicholaSville KY 40356, Estados Unidos, cuyo original examiné

Fechado en Madison, Wisconsin, el 18 de agosto de 2011.

Firma ilegible de Vickie Hoeft notario del Estado de Wisconsin.

Sello oficial. Notario público, Su comisión vence el 24-03 - 2011- 8- 4- 2011 .

ESTADO DE KENTUCKY

Elaine N. Walker. Secretario de estado

División de sociedades anónimas Presentación de negocios Apartado 718 Frankfort KY 40602 (502) 564 23490 http://www.sos.ky.gov	Certificado de Existencia
No. De autenticación 11650	
Visite https:// app.sos.ky.gov/fishow/certvalidate.aspx para autenticar este certificado	

Yo Elaine N. Walker. Secretario de estado de Kentucky, por el presente certifico que conforme a los registros en la oficina del secretario de estado

ALLTECH, INC es una sociedad anónima debidamente constituida y con existencia bajo el capítulo KRS 271B, cuya fecha de constitución es 7 de agosto de 1980, y con un período de duración a perpetuidad.

Certifico además que ha pagado todos los derechos y sanciones debidos al Secretario de estado , que la sociedad no ha presentado artículos de disolución, y que entregó al secretario de estado el informe anual más reciente requerido por KRS 271 B 16- 220.

Firma de Elaine N. Walker. Secretario de estado de Kentucky.

Sello redondo del secretario de estado de Kentucky

: Estado de Wisconsin. - Oficina del Secretario de estado

Sello redondo. certificado

APOSTILLA (Convención De La Haya del 5 octubre de 1961)	
1. País Estados Unidos de América	
2. Este documento Público ha sido firmado por Vickie Hoeft	
3. Quien ejerce funciones de notario público estado de Wisconsin	
4. Lleva el sello notario público del estado de Wisconsin	
CERTIFICADO	
5. En Madison , Wisconsin 6. El 22 de agosto de 2011.	
7. Por el secretario de estado- estado de Wisconsin	
8 No. 210604 9. Sello del estado de Wisconsin	
10. Firma ilegible Douglas Lafollette secretario de estado	

La apostilla solo certifica la autoridad de la persona que firma en el n. 2. no significa que el contenido del documento es correcto o que el secretario apruebe el contenido. -

MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

CERTIFICADO NOTARIAL:

(Copia verdadera)

Estado de Wisconsin
 Condado de Dane) ss
 Yo, Vickie Hoeft Notario público en y para el estado de Wisconsin, debidamente nombrada, certifico que el documento anexo es una copia verdadera del documento que me presentaron y es un Certificado de Constitución de ALLTECH, INC. con oficinas en 3031 Catnip Hill Pike Nicholasville KY 40356, Estados Unidos, cuyo original examiné
 Fechado en Madison, Wisconsin, el 18 de agosto de 2011.
 Firma ilegible de Vickie Hoeft notario del Estado de Wisconsin.
 Sello oficial. Notario público, Su comisión vence el 24-03 - 2011-

ESTADO DE KENTUCKY

Elaine N. Walker. Secretario de estado

CERTIFICADO

Yo Elaine N. Walker. Secretario de estado de Kentucky, por el presente certifico que he comparado cuidadosamente el escrito anterior con el original del mismo, ahora bajo mi custodia oficial como secretario de estado y que permanece en archivo en mi oficina, y encuentro que es una copia verdadera y correcta del CERTIFICADO DE CONSTITUCIÓN DE ALLTECH, INC presentado el 7 de agosto de 1980,
 INFORME ANUAL DE 2001 Presentado el 1 marzo de 2011.
 En testimonio de lo anterior, firmo y estampo el sello oficial en Frankfort, Kentucky el 4 de agosto de 2011.

Firma de Elaine N. Walker. Secretario de estado de Kentucky.
 Sello redondo del secretario Estado De Kentucky-

---- : 148768

ESTADO DE WISCONSIN. - Oficina del Secretario de estado
 Frances Jones Mills – secretaria Sello redondo. Frankfort Kentucky

CERTIFICADO DE CONSTITUCIÓN

Yo Frances Jones Mills. Secretario de estado de Kentucky, por el presente certifico que he se ha presentado en esta oficina el Certificado De Constitución De

ALLTECH, INC , cuyo agente inicial para proceso es Thomas Pearse Lyons, dirección Lane Allen Plaza, 845 Lane Allen Road. Dirección en Lexington Kentucky, debidamente firmado conforme a la ley. Certifico además que esa compañía ha pagado todos los impuestos, derechos, y cargos pagaderos al momento de presentar tal Acta Constitutiva.

Expedido con mi firma y sello oficial de Secretario de Estado en Frankfort, Kentucky el 7 de agosto de 1980.

Firma de Frances Jones Mills.. Secretario de estado de Kentucky.
 Sello redondo del secretario Estado De Kentucky-

Marlen Neira Castro
 MARLEN NEIRA CASTRO
 Traductor e Intérprete Oficial
 Inglés - Español - Inglés
 Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

4/5

CERTIFICADO DE CONSTITUCIÓN DE ALLTECH, INC.

El suscrito Thomas Pearse Lyons, de Lexington Kentucky, por el presente constituye una sociedad anónima conforme a las leyes del estado de Kentucky

Artículo 1.

La razón social de la sociedad es Alltech, Inc.

Artículo II.

La sociedad tiene una duración a perpetuidad, a menos de que se disuelva antes conforme a las leyes del estado de Kentucky,

Artículo III

- El objeto social de la sociedad es producir bioquímicos para la industria alimentaria y actuar como consultores de la misma. Además de lo anterior, el objeto de la sociedad incluye hacer la transacción de todo negocio legal para los que se constituyan sociedades conforme a las leyes del estado de Kentucky.

Artículo IV.

El número total de acciones autorizadas de la sociedad es dos mil (2.000), acciones con valor nominal y el tenedor de cada acción de capital tendrá derecho a un voto por acción.

Artículo V. La oficina registrada inicial de la sociedad es: Lane Allen Plaza 845 Lane Allen Road, Lexington, Kentucky 40504. El agente inicial registrado de la sociedad anterior es: Thomas Pearse Lyons.

Artículo VI.

La junta directiva inicial consiste en una (1) persona que será Thomas Pearse Lyons, 35 29 Cornwall Drive, Lexington, Kentucky 40503. El director continuará sirviendo hasta que se elija y califique su sucesor. La organización subsiguiente de la Junta Directiva incluyendo el número de directores, se regirá por las leyes (N.-T.: texto cortado)

Artículo VII. El fundador de la sociedad es Thomas Pearse Lyons, 3529 Cornwall Drive, Lexington, Kentucky 40503.

Artículo VIII-

Esta sociedad tendrá todos los poderes otorgados a la sociedad conforme a las leyes del estado de Kentucky.

En testimonio de lo anterior, firma el fundador el 6 de agosto 1980.

Firma Thomas Pearse Lyons.

Estado de Kentucky)

Condado Fayette

Suscrito y legalizado ante mí por Thomas Pearse Lyons el 6 de agosto de 1980.

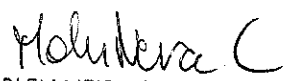
Su comisión vence el 8-27- 83.

Firma ilegible del Notario publico para todo el estado de Kentucky.

Preparado por Gerald Cassidy & Moloney.

605 Court Square Building. Lexington KY 40507

Por Oscar H. Geraldts, JR.


MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

12

ESTADO DE KENTUCKY

Elaine N. Walker. Secretario de estado

01480148768

Elaine N. Walker Secretario de estado- Recibido y archivado

3/1/2011 4:08:15 PM pago de derechos: \$15.00

Apartado 1150 Frankfort KY 40602 (502) 564 23490 http://www.sos.ky.gov		INFORME ANUAL PRESENTACION EN LINEA - ARP	
Compañía ALLTECH, INC.			
Identificación de compañía 0148768			
Estado de Origen		Kentucky	
Fecha de constitución		817/1980 hora 12:00:00 AM	
Fecha de presentación		3/11201 hora 14:08:15 PM	
Derechos pagados		\$15.06	
Oficina Principal			
3031 CATNIP HILL NICHOLASVILLE, KY 40356			
Nombre de agente Registrado/dirección			
National Registered Agents, Inc			
400 West Market Street Suite 1800 Louisville, Ky 40202 .			
Funcionarios actuales			
Presidente		Thomas Pearse Lyons 3031 Catnip Hill Pike, Nicholasville; KY 40356	
Secretario		Nathan H Hohman . 3031 Catnip Hill Pike, Nicholasville; KY 40356	
Tesorero		Nathan Hohman 3031 Catnip Hill Pike, Nicholasville; KY 40356	
Vice Presidente		Mark Pearse. Lyons Catnip Hill Pike, Nicholasville; KY 40356	
Directores			
Director		Thomas Pearse Lyons Catnip Hill Pike, Nicholasville; KY 40356	
Director		Nathan H Hohman Catnip Hill Pike, Nicholasville; KY 40356	
Firmas			
Firma Nathan Hohman			
Cargo SecretarioTesorero			

Es traducción conforme con copia para confrontar. Bogota. Sept 6- 2011.

Marlen Neira Castro

MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



WIPO | PCT



(10) International Publication Number
WO 2013/010090 A2

(43) International Publication Date
17 January 2013 (17.01.2013)

- (51) **International Patent Classification:**
C12N 1/12 (2006.01) *C10L 1/10* (2006.01)
C11B 1/00 (2006.01)
- (21) **International Application Number:**
PCT/US2012/046696
- (22) **International Filing Date:**
13 July 2012 (13.07.2012)
- (25) **Filing Language:** English
- (26) **Publication Language:** English
- (30) **Priority Data:**
61/507,390 13 July 2011 (13.07.2011) US
- (71) **Applicant** (for all designated States except US): **ALL-TECH, INC.** [US/US]; 3031 Catnip Hill Pike, Nicholasville, Kentucky 40356 (US).
- (72) **Inventors; and**
- (75) **Inventors/Applicants** (for US only): **RANEY, Kyle, A.** [US/US]; 115 Hibiscus Lane, Winchester, Kentucky 40391 (US). **TIMMONS, Rebecca, A.** [US/US]; 1830 McDonald Avenue, Lexington, Kentucky 40503 (US).
- (74) **Agent:** **SISK, Tyler, J.**; Casimir Jones, S.C., 2275 Deming Way, Suite 310, Middleton, WI 53562 (US).

- (81) **Designated States** (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) **Designated States** (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))

(54) **Title:** ALGAL LIPID COMPOSITIONS AND METHODS OF PREPARING AND UTILIZING THE SAME

(57) **Abstract:** This invention relates to compositions comprising high lipid content algae and methods of making and utilizing the same. In particular, the invention relates to high lipid content algae biomass and algal lipid materials derived from the same, methods of making the same, as well as to biofuels (e.g., biodiesel) and dietary compositions (e.g., animal feeds) comprising or made from the same. Compositions and methods of the invention find use in a variety of applications including biofuel, dietary (e.g., human and animal nutrition), therapeutic as well as research applications.



WO 2013/010090 A2

ALGAL LIPID COMPOSITIONS AND METHODS OF PREPARING AND UTILIZING THE SAME

This Application claims priority to U.S. Provisional Patent Application Serial No.
5 61/507,390 filed 13 July 2011, hereby incorporated by reference in its entirety.

FIELD OF THE INVENTION

This invention relates to compositions comprising high lipid content algae and
methods of making and utilizing the same. In particular, the invention relates to high lipid
10 content algae biomass and algal lipid materials derived from the same, methods of making
the same, as well as to biofuels (e.g., biodiesel) and dietary compositions (e.g., animal feeds)
comprising or made from the same. Compositions and methods of the invention find use in a
variety of applications including biofuel, dietary (e.g., human and animal nutrition),
therapeutic as well as research applications.

15

BACKGROUND OF THE INVENTION

Within the last several years, the production of biofuel (e.g., biodiesel) from algae has
been an area of interest. In part, this is due to high quality agricultural land not being
required to grow algae (algal biomass). However, commercial production of biofuel (e.g.,
20 biodiesel) from algae has remained a challenge.

In addition, over the last fifty years, approaches toward providing animal nutrition
have changed. No longer are animals fed whatever forage or other material that may be
available. Instead, the diets of animals are closely monitored for total nutrition value and
cost. Very often, animals on specific diets are monitored for quality and performance
25 characteristics with the nutritional components of the feed being adjusted to maximize
nutrition value of the feed and optimization of animal performance characteristics.

However, cost is a critical factor. There is a continual search for cost-effective animal
feeds, not only to sustain animals, but in many cases to cause enhanced growth and value.

30

SUMMARY OF THE INVENTION

The invention relates to compositions comprising high lipid content algae and
methods of making and utilizing the same. In particular, the invention relates to high lipid

content algae biomass and algal lipid materials derived from the same, methods of making the same, as well as to biofuels (e.g., biodiesel) and dietary compositions (e.g., animal feeds) comprising or made from the same. Compositions and methods of the invention find use in a variety of applications including biofuel, dietary (e.g., human and animal nutrition),
5 therapeutic as well as research applications.

Accordingly, the invention provides a process of making an algal biomass comprising a desired, high fat content (e.g., at least 67% total fat) comprising culturing an algae under culture conditions sufficient to provide an algal biomass comprising a desired, high fat content. The invention has identified culture conditions under which it is possible to obtain
10 an algal biomass comprising a desired level of total fat (e.g., at least 67% total fat). The invention is not limited to the total fat content (e.g., by weight) of an algal biomass generated according to the invention. In a preferred embodiment, an algal biomass generated and/or used according to the invention comprises a fat content of at least 67% by weight. However, the invention also provides compositions and methods of generating an algal biomass
15 containing greater (e.g., greater than 68%, greater than 69%, greater than 70%, greater than 71%, greater than 72%, greater than 73%, greater than 74%, greater than 75%, greater than 76%, greater than 77%, greater than 78%, greater than 79%, greater than 80%, greater than 81%, greater than 82%, greater than 85%, or more) or lesser (e.g., about 66%, about 65%, about 64%, about 63%, about 62%, about 61%, about 60%, about 59%, about 58%, about
20 57%, about 56%, about 55%, about 54%, or less) amount of total fat. Indeed, methods and compositions described herein can be utilized to generate an algal biomass containing any desired level of total fat content. In some embodiments, the algae biomass is cultured in two or more types of culture medium in a sequential manner. For example, in some
embodiments, one culture medium of the two or more culture medium contains 50 g/L of a
25 carbon source, about 7.5 g/L yeast extract, about 0.15 g/L magnesium sulfate, about 0.15 g/L calcium chloride and 0.15 g/L magnesium chloride. The invention is not limited by the carbon source. Indeed, a variety of carbon sources may be used including, but not limited to, carbohydrates such as glucose, fructose, xylose, saccharose, maltose or soluble starch as well as oleic acid, fats such as soybean oil, molasses, glycerol, mannitol, and sodium acetate,
30 cotton seed flour, glycerol, molasses and corn steep liquor. In some embodiments, another culture medium of the two or more culture medium contains 50 g/L of a carbon source, about 7.5 g/L yeast extract, about 4.0 g/L magnesium sulfate, about 1 g/L urea, about 2 g/L calcium chloride, about 2 g/L magnesium chloride and about 0.25 g/L monopotassium phosphate. In some embodiments, one culture medium of the two or more culture medium contains a

carbon source, yeast extract and sea salt. In some embodiments, and as described herein, algae are cultured in a first culture medium (e.g., containing glucose, yeast extract and sea salt); transferred into and incubated in a second culture medium (e.g., containing glucose, yeast extract, magnesium sulfate, calcium chloride and magnesium chloride); and transferred
5 into and incubated in a third culture medium (e.g., containing glucose, yeast extract, magnesium sulfate, urea, calcium chloride, magnesium chloride and monopotassium phosphate). In some embodiments, one of the culture mediums is supplemented with a fed-batch feed. In a preferred embodiment, the third culture medium is supplemented with a fed-batch feed. The invention is not limited by the type, or duration, of fed-batch feed utilized.

10 In some embodiments, the fed-batch feed comprises urea and monopotassium phosphate. The invention is not limited by the amounts and/or ratios of media components used in the cultures. Examples that may be utilized as components of each of the various media (e.g., first culture media, second culture media, batch media and fed-batch media) are described in detail herein. In some embodiments, the algal biomass is harvested from a culture (e.g., from
15 a third culture medium) between 12-24 hours after cessation of the fed-batch process. In some embodiments, the algal biomass is harvested from the third culture medium after all of the nutrients have been removed/consumed from the medium. The invention is not limited by the way in which the algal biomass is harvested. Indeed, a variety of ways may be used to harvest the biomass including, but not limited to, the methods described herein. In some
20 embodiments, the algal biomass is harvested via centrifugation. In some embodiments, the culture medium comprising the algal biomass is chilled prior to harvesting the algal biomass. The invention is not limited by the temperature to which the culture medium comprising the algal biomass is chilled prior to harvesting. Indeed, a variety of temperatures may be used including, but not limited to, those described herein. In some embodiments, the culture
25 medium comprising the algal biomass is chilled to between about 5 and 25 C. The invention is not limited by the type of algae used in the invention. Indeed, a variety of algae may be used (e.g., independently or in combination) including, but not limited to, those described herein. In some embodiments, the algae is a strain or species from the genus *Chlorella*, the genus *Schizochytrium*, or the genus *Cryptocodinium*. In a preferred embodiment, the algae
30 is *Schizochytrium limacinum*. In some embodiments, the first culture medium contains about 50 g/L glucose, about 10 g/L yeast extract and about 4 g/L sea salt. In some embodiments, the second culture medium contains about 50 g/L glucose, about 7.5 g/L yeast extract, about 0.15 g/L magnesium sulfate, about 0.15 g/L calcium chloride and 0.15 g/L magnesium chloride. In some embodiments, the third culture medium contains about 50 g/L glucose,

about 7.5 g/L yeast extract, about 4.0 g/L magnesium sulfate, about 1 g/L urea, about 2 g/L calcium chloride, about 2 g/L magnesium chloride and about 0.25 g/L monopotassium phosphate. In some embodiments, the culture conditions comprise running the algae culture at 30 C under airflow and agitation conditions so as to maintain dissolved oxygen at about 10%. In some embodiments, the third culture medium (e.g., the culture media present at the time of inoculation of a main fermentor (e.g., 70,000 L, 120,000 L, 256,000 L vessel)) contains medium with an initial ratio of nitrogen (N):phosphorus (P):potassium (K) of 46:13:8.5. In a preferred embodiment, the N:P:K ratio is the same in the batch and fed-batch culture modes. In some embodiments, the ratio of magnesium (Mg):calcium (Ca) is 3:1 in culture media used in both batch and fed-batch modes, although higher (e.g., 4:1, 4.5:1, or more) and lower (e.g., 2.5:1, 2:1, 1.5:1, or lower) ratios may be used. In another embodiment, the ratio of chloride (Cl⁻):sulfate (SO₄²⁻) of 1:1 is used in culture media used in both batch and fed-batch modes, although higher (e.g., 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, or more) and lower (e.g., 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, or lower) ratios may be used. In some embodiments, the ratio of sulfate (SO₄²⁻):phosphate (PO₄³⁻) in media at the time of inoculation of a main fermentor (e.g., 70,000 L, 120,000 L, 256,000 L vessel) is 16:1, although higher (e.g., 20:1, 25:1, 30:1, 32:1, or more) and lower (e.g., 10:1, 8:1, 5:1, 3:1, or lower) ratios may be used. In some embodiments, the total ratio of sulfate (SO₄²⁻):phosphate (PO₄³⁻) that has been batched and fed at the end of a full culture (e.g., including inoculum, first seed stage, second seed stage and main fermentor cultures) that generates an algal biomass containing a desired fat content (e.g., greater than 67% fat) is 5.3:1, although higher (e.g., 5.5:1, 5.7:1, 6:1, 7:1, 8:1 or higher) and lower (e.g., 5:1, 4.5:1, 4:1, 3:1, or lower) ratios may be used. In some embodiments, the ratio of chloride (Cl⁻):phosphate (PO₄³⁻) in media at the time of inoculation of a main fermentor (e.g., 70,000 L, 120,000 L, 256,000 L vessel) is 16:1, although higher (e.g., 20:1, 25:1, 30:1, 32:1, or more) and lower (e.g., 10:1, 8:1, 5:1, 3:1, or lower) ratios may be used. In some embodiments, the total ratio of chloride (Cl⁻):phosphate (PO₄³⁻) that has been batched and fed at the end of a full culture (e.g., including inoculum, first seed stage, second seed stage and main fermentor cultures) that generates an algal biomass containing a desired fat content (e.g., greater than 67% fat) is 5.3:1, although higher (e.g., 5.5:1, 5.7:1, 6:1, 7:1, 8:1 or higher) and lower (e.g., 5:1, 4.5:1, 4:1, 3:1, or lower) ratios may be used.

The invention also provides an algal biomass having a desired, high fat content (e.g., total fat content of at least 67% by weight). In some embodiments, the biomass comprises about 170-250 mg/g docosahexaenoic acid (DHA) and/or about 150-400 mg/g palmitic acid. In some embodiments, the invention provides a lipid composition, a food product or other

material comprising the algal biomass (e.g., dried algal biomass) or a component thereof (e.g., a fatty acid component thereof). In some embodiments, the algal biomass (e.g., a dried algal biomass (e.g., generated according to a method described herein)) contains a desired amount of total fat and/or other components (e.g., greater than about 68% total fat, greater than about 69% total fat, greater than about 70% total fat, greater than about 71% total fat, greater than about 72% total fat, greater than about 73% total fat, greater than about 74% total fat, greater than about 75% total fat, greater than about 76% total fat, greater than about 77% total fat, or greater than about 78% total fat). In some embodiments, an algal biomass of the invention (e.g., containing greater than 67% total fat) is dried such that the biomass contains less than 5% moisture (e.g., less than 4.5% moisture, less than 4% moisture, less than 3.5% moisture, less than 3% moisture, less than 2.5% moisture, less than 2% moisture, or less than 1.5% moisture). In some embodiments, an algal biomass of the invention (e.g., a dried biomass containing less than 5% moisture) contains about 170-250 mg/g or more docosahexaenoic acid (DHA) (e.g., about 170-180 mg/g DHA, about 180-190 mg/g DHA, about 190-200 mg/g DHA, about 200-210 mg/g DHA, about 210-220 mg/g DHA, about 220-230 mg/g DHA, about 230-240 mg/g DHA, about 240-250 mg/g DHA, or more than 250 mg/g DHA). In some embodiments, an algal biomass of the invention (e.g., a dried biomass containing less than 5% moisture) contains about 150-400 mg/g or more palmitic acid (IUPAC name: hexadecanoic acid (e.g., about 150-200 mg/g, about 200-225 mg/g, about 225-250 mg/g, about 250-275 mg/g, about 275-300 mg/g, about 300-325 mg/g, about 325-350 mg/g, about 350-375 mg/g, about 375-400 mg/g, or more than 400 mg/g)). In some embodiments, an algal biomass of the invention (e.g., a dried biomass containing less than 5% moisture) contains about 300-600 mg/g or more total fatty acids (e.g., about 300-350 mg/g, about 350-400 mg/g, about 400-450 mg/g, about 450-500 mg/g, about 500-550 mg/g, about 550-600 mg/g, or more than 600 mg/g fatty acids)). In some embodiments, an algal biomass of the invention (e.g., a dried biomass containing less than 5% moisture) contains less than about 15% protein (e.g., less than about 14% protein, less than about 13% protein, less than about 12% protein, less than about 11% protein, less than about 10% protein, less than about 9% protein, or less than about 8% protein). In some embodiments, an algal biomass or component thereof of the invention is used in preparing biofuel (e.g., biodiesel). In some embodiments, an algal biomass or component thereof of the invention is used in preparing a food product (e.g., an animal feed or feed component).

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

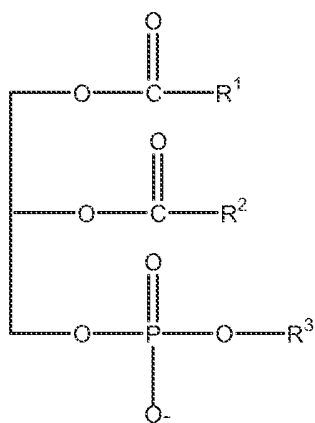
Figure 1 depicts data generated during large scale, heterotrophic algae biomass production according to aspects of the invention.

Figure 2 shows the fatty acid profile of algae biomass harvested from several, independent large scale algal cultures.

5 Figure 3 shows a composite fatty acid profile of a harvested biomass utilizing materials and methods described herein.

DEFINITIONS

As used herein, "phospholipid" refers to an organic compound having the following
10 general structure:



wherein R1 is a fatty acid residue, R2 is a fatty acid residue or --OH, and R3 is a --H or
15 nitrogen containing compound choline ($\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{OH}^-$), ethanolamine ($\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), inositol or serine. R1 and R2 cannot simultaneously be OH. When R3 is an --OH, the compound is a diacylglycerophosphate, while when R3 is a nitrogen-containing compound, the compound is a phosphatide such as lecithin, cephalin, phosphatidyl serine or plasmalogen.

20 An "ether phospholipid" as used herein refers to a phospholipid having an ether bond at position 1 the glycerol backbone. Examples of ether phospholipids include, but are not limited to, alkylacylphosphatidylcholine (AAPC), lyso-alkylacylphosphatidylcholine (LAAPC), and alkylacylphosphatidylethanolamine (AAPE). A "non-ether phospholipid" is a phospholipid that does not have an ether bond at position 1 of the glycerol backbone.

25 As used herein, the term "omega-3 fatty acid" refers to polyunsaturated fatty acids that have the final double bond in the hydrocarbon chain between the third and fourth carbon

atoms from the methyl end of the molecule. Non-limiting examples of omega-3 fatty acids include, 5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid (EPA), 4,7,10,13,16,19-docosahexanoic acid (DHA) and 7,10,13,16,19-docosapentanoic acid (DPA).

As used herein, the terms "triacylglycerid" "triglyceride" and "triacylglycerol" and "TAG" refer to is an ester derived from glycerol and three fatty acids, wherein "fatty acid" refers to a carboxylic acid with a long unbranched aliphatic tail (chain), which is either saturated or unsaturated. Palmitic acid is one, non-limiting example of a triacylglyceride.

As used herein, the terms "% w/w (weight/weight) " and "w/w %" and grammatical equivalents refer to the amount (percent) of a given substance in a composition on weight:weight basis. For example, a composition comprising 50% w/w phospholipids means that the mass of the phospholipids is 50% of the total mass of the composition (i.e., 50 grams of phospholipids in 100 grams of the composition, such as an oil).

As used herein the term "algae" refers to a unicellular or multicellular organism formerly classified as plants, occurring in fresh or salt water, autotrophic or heterotrophic, but that lack true stems, roots, and leaves. As used herein the term "heterotrophic" refers to an organism that cannot synthesize its own food and is dependent on organic substances (e.g., complex and/or simple organic substances) for nutrition. Thus, the term "heterotrophic algae" refer to an algae that cannot synthesize its own food and is dependent on organic substances for nutrition. As used herein, the term "autotrophic" refers to an organism capable of synthesizing its own food from inorganic substances, using light or chemical energy. The use of the term "algal" also relates to microalgae and thus encompasses the meaning of "microalgal." The term "algal composition" refers to any composition that comprises algae, such as an aquatic composition, and is not limited to the body of water or the culture in which the algae are cultivated. An algal composition can be an algal culture, algal biomass, a concentrated algal culture, or a dewatered mass of algae, and can be in a liquid, semi-solid, or solid form. A non-liquid algal composition can be described in terms of moisture level or percentage weight of the solids. An "algal culture" is an algal composition that comprises live algae. The term "algae" includes macroalgae (commonly known as seaweed) and microalgae.

As used herein, the terms "algal biomass" or "biomass" refers to a collection or mass of algal cells grown in a given area or ecosystem at a given time. The area or ecosystem may be a naturally occurring environment (e.g., body of water) or a synthetic environment (e.g., in a fermentor or bioreactor (e.g., open or closed)).

As used herein, the term "total fat" refers to the sum of triglycerides, phospholipids, wax ester, and sterols present in a material. For example, "total fat" content of an algal biomass refers to the sum of triglycerides, phospholipids, wax ester, and sterols present in the biomass. In addition, total fat includes both saturated and unsaturated fats.

5 As used herein, the term "preservative" refers to an agent that extends the storage life of food and non-food products by retarding or preventing deterioration of flavor, odor, color, texture, appearance, nutritive value, or safety. A preservative need not provide a lethal, irreversible action resulting in partial or complete microbial cell destruction or incapacitation. Sterilants, sanitizers, disinfectants, sporicides, virucides and tuberculocidal agents provide
10 such an irreversible mode of action, sometimes referred to as "bactericidal" action. In contrast, a preservative can provide an inhibitory or bacteriostatic action that is reversible, in that the target microbes can resume multiplication if the preservative is removed. The principal differences between a preservative and a sanitizer primarily involve mode of action (a preservative prevents growth rather than killing microorganisms) and exposure time (a
15 preservative has days to months to act whereas a sanitizer has at most a few minutes to act).

As used herein, the term "yeast" and "yeast cells" refers to eukaryotic microorganisms classified in the kingdom Fungi, having a cell wall, cell membrane and intracellular components. Yeasts do not form a specific taxonomic or phylogenetic grouping. Currently about 1,500 species are known; it is estimated that only 1% of all yeast species have been
20 described. The term "yeast" is often taken as a synonym for *S. cerevisiae*, but the phylogenetic diversity of yeasts is shown by their placement in both divisions Ascomycota and Basidiomycota. The budding yeasts ("true yeasts") are classified in the order Saccharomycetales. Most species of yeast reproduce asexually by budding, although some reproduce by binary fission. Yeasts are unicellular, although some species become
25 multicellular through the formation of a string of connected budding cells known as *pseudohyphae*, or *false hyphae*. Yeast size can vary greatly depending on the species, typically measuring 3–4 μm in diameter, although some yeast can reach over 40 μm .

As used herein, the terms "selenium-enriched yeast" and "selenized yeast" refer to any yeast (e.g., *Saccharomyces cerevisiae*) that is cultivated in a medium containing inorganic
30 selenium salts. The present invention is not limited by the selenium salt used. Indeed, a variety of selenium salts are contemplated to be useful in the present invention including, but not limited to, sodium selenite, sodium selenate, cobalt selenite or cobalt selenate. Free selenomethionine (e.g., not associated with a cell or yeast) can also be used as the selenium source for selenium enriched yeast as yeast does incorporate this form of selenium. During

cultivation, because of the chemical similarity between selenium and sulfur, yeast incorporate selenium in place of sulfur in what are normally sulfur-containing organic compounds within the cell. A selenium-containing compound in such yeast preparations is selenomethionine which will be present in a form that is incorporated into polypeptides/proteins. The amount of total cellular selenium present in the form of selenomethionine in such preparations will vary, but can be between 10 and 100%, 20-60%, 50-75% and between 60 and 75%. The remainder of the organic selenium in selenized yeast preparations is predominantly made up of intermediates in the pathway for selenomethionine biosynthesis. These include, but are not limited to, selenocysteine, selenocystathionine, selenohomocysteine and seleno-adenosylselenomethionine. The amount of residual inorganic selenium salt in the finished product is generally quite low (< 2%). However, the present invention is not limited by this percentage, as preparations that contain more (e.g., between 2 and 70%) or less (e.g., between 0.1 and 2%) than this percentage are also encompassed by the invention.

As used herein, the term "SEL-PLEX" refers to a dried, nonviable selenium-enriched yeast (e.g., *Saccharomyces cerevisiae* of accession number CNCM I-3060, Collection Nationale De Cultures De Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, Paris, France) cultivated in a fed-batch fermentation that provides incremental amounts of cane molasses and selenium salts in a manner that minimizes the detrimental effects of selenium salts on the growth rate of the yeast and allows for optimal incorporation of inorganic selenium into cellular organic material. Residual inorganic selenium is eliminated (e.g., using a rigorous washing process) and does not exceed 2% of the total selenium content.

As used herein, the term "organic selenium" refers to any organic compound wherein selenium replaces sulfur. Thus, organic selenium can refer to any such compound biosynthesized by yeast, or it can refer to free organic seleno-compounds that are chemically synthesized. An example of the latter is free selenomethionine.

As used herein, the term "inorganic selenium" generally refers to any selenium salt (e.g., sodium selenite, sodium selenate, cobalt selenite and cobalt selenate). There are also a variety of other inorganic selenium sources (See e.g., those listed in the Merck index). Selenized yeast may be generated using a source of inorganic selenium including, but not limited to, sodium selenite, sodium selenate, cobalt selenite, cobalt selenate, selenic acid, selenious acid, selenium bromide, selenium chloride, selenium hexafluoride, selenium oxide, selenium oxybromide, selenium oxychloride, selenium oxyfluoride, selenium sulfides, selenium tetrabromide, selenium tetrachloride and selenium tetrafluoride.

As used herein, the term "yeast cell wall" also referred to as "YCW" refers to the cell wall of a yeast organism that surrounds the plasma membrane and the intracellular components of the yeast. Yeast cell wall includes both the outer layer (mainly mannan) and the inner layer (mainly glucan and chitin) of the yeast cell wall. A function of the cell wall is to provide structure and protect the metabolically active cytoplasm. Signaling and recognition pathways take place in the yeast cell wall. The composition of yeast cell wall varies from strain to strain and according to growth conditions of yeast.

As used herein, the term "purified" or "to purify" refers to the removal of components from a sample. For example, yeast cell walls or yeast cell wall extracts are purified by removal of non-yeast cell wall components (e.g., plasma membrane and/or yeast intracellular components); they are also purified by the removal of contaminants or other agents other than yeast cell wall. The removal of non-yeast cell wall components and/or non-yeast cell wall contaminants results in an increase in the percent of yeast cell wall or components thereof in a sample.

As used herein, the term "in vivo" refers to studies and/or experiments conducted within a living organism, occurring within a biological organism.

As used herein, the term "in vitro" refers to an artificial environment outside the living organism and to biological processes or reactions that would normally occur within an organism but are made to occur in an artificial environment. In vitro environments can comprise, but are not limited to, test tubes and cell culture.

As used herein, the term "high-performance liquid chromatography" and the term "HPLC" refer to a form of liquid chromatography to separate compounds. The compounds are dissolved in solution. Compounds are separated by injecting a plug of the sample mixture onto the column. HPLC instruments comprise a reservoir of mobile phase, a pump, an injector, a separation column, and a detector. The presence of analytes in the column effluent is recorded by quantitatively detecting a change in refractive index, UV-VIS absorption at a set wavelength, fluorescence after excitation with a suitable wavelength, or electrochemical response.

As used herein, the term "scanning electron microscopy" and the term "SEM" refer to use of a type of electron microscope that images the sample surface by scanning it with a high-energy beam of electrons in a raster scan pattern. The electrons interact with the atoms that make up the sample producing signals that contain information about the sample's surface topography, composition and other properties such as electrical conductivity.

As used herein, the term "fixation agent" refers to a chemical that is capable of fixing one substance to another in order to "fix", stabilize, or otherwise preserve the substance in its current form to prevent the substance from degrading or otherwise changing. Often, fixation agents are used in scanning electron microscopy (SEM) to prepare the sample. Primary
5 fixation agent: as used herein, the terms "primary fixation agent" refers to the first fixation agent used to "fix" a substance. Secondary fixation agent: as used herein, the terms "secondary fixation agent" refers to the second fixation agent used to "fix" a substance. Tertiary fixation agent: as used herein, the terms "tertiary fixation agent" refers to the third fixation agent used to "fix" a substance.

10 As used herein, the term "analyte" refers to an atom, a molecule, a grouping of atoms and/or molecules, a substance, or chemical constituent. An analyte, in and of itself cannot be measured; rather, aspects or properties (physical, chemical, biological, etc.) of the analyte can be determined using an analytical procedure, such as HPLC. For example, one cannot measure a "chair" (analyte-component) in and of itself, but, the height, width, etc. of a chair
15 can be measured. Likewise, one cannot measure a mycotoxin but can measure the mycotoxin fluorescence that is related to its concentration.

As used herein, the term "signal" is used generally in reference to any detectable process that indicates that a reaction has occurred (for example, binding of antibody to antigen). Signals can be assessed qualitatively as well as quantitatively. Examples of types
20 of "signals" include, but are not limited to, radioactive signals, fluorimetric signals or colorimetric product/reagent signals.

As used herein, the term "bioavailability" refers to the fraction of a molecule or component that is available to an organism or reaches the systemic circulation. When a molecule or component is administered intravenously, its bioavailability is 100%. However,
25 when a molecule or component is administered via other routes (such as orally), its bioavailability decreases (due to incomplete absorption and first-pass metabolism). In a nutritional setting, bioavailability refers to the rates of absorption and utilization of a nutrient. Different forms of the same nutrient, for example, may have different bioavailabilities.

As used herein, the term "effective amount" refers to the amount of a composition
30 sufficient to effect beneficial or desired results. An effective amount can be administered and/or combined with another material in one or more administrations, applications or dosages and is not intended to be limited to a particular formulation or administration route.

As used herein, the term "digest" refers to the conversion of food, feedstuffs, or other organic compounds into absorbable form; to soften, decompose, or break down by heat and moisture or chemical action.

As used herein, "digestive system" refers to a system (including gastrointestinal
5 system) in which digestion can or does occur.

As used herein, the term "feedstuffs" refers to material(s) that are consumed by mammals (e.g., humans and animals) and contribute energy and/or nutrients to a mammal's diet. Examples of feedstuffs include, but are not limited to, Total Mixed Ration (TMR), forage(s), pellet(s), concentrate(s), premix(es) coproduct(s), grain(s), distiller grain(s),
10 molasses, fiber(s), fodder(s), grass(es), hay, kernel(s), leaves, meal, soluble(s), and supplement(s).

As used herein, the terms "food supplement" "dietary supplement" "dietary supplement composition" and the like refer to a food product formulated as a dietary or nutritional supplement to be used as part of a diet. Exemplary dietary supplement
15 compositions are described herein.

As used herein, the term "animal" refers to those of kingdom Animalia. This includes, but is not limited to livestock, farm animals, domestic animals, pet animals, marine and freshwater animals, and wild animals.

As used herein, the terms "administration" and the term "administering" refer to the
20 act of giving a substance, including a drug, prodrug, or other agent, or therapeutic treatment to a subject (e.g., a subject or in vivo, in vitro, or ex vivo cells, tissues, and organs). Exemplary routes of administration can be through the eyes (ophthalmic), mouth (oral), skin (topical or transdermal), nose (nasal), lungs (inhalant), oral mucosa (buccal), ear, rectal, vaginal, by injection (e.g., intravenously, subcutaneously, intratumorally, intraperitoneally,
25 etc.) and the like.

As used herein, the term "co-administration" and the term "co-administering" refer to the administration of at least two agent(s) or therapies to a subject and/or material (e.g., feedstuff). Co-administration of two or more agents or therapies can be concurrent, or a first agent/therapy can be administered prior to a second agent/therapy.

As used herein, the term "treatment" refers to measures taken that facilitate the
30 improvement and/or reversal of the symptoms of disease. The term "treatment" refers to both therapeutic treatment and prophylactic or preventative measures. For example, subjects that may benefit from treatment with compositions and methods of the present invention include

those already with a disease and/or disorder as well as those in which a disease and/or disorder is to be prevented (e.g., using a prophylactic treatment of the present invention).

As used herein, the term "at risk for disease" refers to a subject that is predisposed to experiencing a particular disease. This predisposition may be genetic (e.g., a particular
5 genetic tendency to experience the disease, such as heritable disorders), or due to other factors (e.g., age, weight, environmental conditions, exposures to detrimental compounds present in the environment, etc.).

As used herein, the term "disease", the term "infection" and the term "pathological condition or response" refer to a state, signs, and/or symptoms that are associated with an
10 impairment of the normal state of a living animal or of any of its organs or tissues that interrupts or modifies the performance of normal functions, and may be a response to environmental factors (such as malnutrition, industrial hazards, or climate, including mycotoxicosis), specific infective agents (such as worms, bacteria, or viruses), to inherent defect of the organism (such as various genetic anomalies), or combinations of these and
15 other factors.

As used herein, the term "suffering from disease" refers to a subject (e.g., an animal or human subject) that is experiencing a particular disease and is not limited to any particular signs or symptoms, or disease.

As used herein, the term "toxic" refers to any detrimental, deleterious, harmful, or
20 otherwise negative effect(s) on a subject, a cell, or a tissue as compared to the same cell or tissue prior to the contact or administration of the toxin/ toxicant.

As used herein, the term "pharmaceutical composition" refers to the combination of an active agent with a carrier, inert or active, making the composition especially suitable for diagnostic or therapeutic use in vitro, in vivo or ex vivo.

25 As used herein, the term "pharmaceutically acceptable" and the term "pharmacologically acceptable" refer to compositions that do not substantially produce more known adverse reactions than known beneficial reactions.

As used herein, the term "inoculation" refers to the act of introducing a microorganism or suspension of microorganisms (e.g., algae, yeast, fungi, bacteria, etc.) into
30 a culture medium. Inoculation is the act or process of introducing something into an environment in which it will grow or reproduce.

As used herein, the term "inoculum" and the term "pre-inoculum" refer to cells used in an inoculation, such as cells added to start a culture.

As used herein, the term "centrifugation" refers to the separating of molecules by size or density using centrifugal forces generated by a spinning rotor that puts an object in rotation around a fixed axis, applying a force perpendicular to the axis. The centrifuge works using the sedimentation principle, where the centripetal acceleration is used to evenly distribute substances of greater and lesser density into different layers of density.

As used herein, the term "concentration" refers to the amount of a substance per defined space. Concentration usually is expressed in terms of mass per unit of volume. To dilute a solution, one must add more solvent, or reduce the amount of solute (e.g., by selective evaporation, spray drying, freeze drying, e.g., concentrated yeast cell wall extract or concentrated modified yeast cell wall extract). By contrast, to concentrate a solution, one must add more solute, or reduce the amount of solvent.

As used herein, the term "layer" refers to a usually horizontal deposit organized in stratum of a material forming an overlying part or segment obtained after separation by centrifugation in relation with the density properties of the material.

As used herein, the term "harvest" refers to the act of collecting or bringing together materials that have been produced (e.g. bringing together materials produced during yeast production).

As used herein, the term "drying" refers to spray drying, freeze drying, air drying, vacuum drying or any other kind of process that reduces or eliminates liquid in a substance.

As used herein, the term "spray drying" refers to a commonly used method of drying a substance containing liquid using hot gas to evaporate the liquid to reduce or eliminate liquid in the substance. In other words the material is dried by way of spraying or atomizing into a draft of heated dry air.

As used herein, the term "freeze-drying" and the term "lyophilization" and the term "cryodesiccation" refer to the removal of a solvent from matter in a frozen state by sublimation. This is accomplished by freezing the material to be dried below its eutectic point and then providing the latent heat of sublimation. Precise control of heat input permits drying from the frozen state without product melt-back. In practical application, the process is accelerated and precisely controlled under reduced pressure conditions.

As used herein, the term "dry free flowing powder" refers to a free flowing dry powder, e.g. a powder that can be poured from a container, bag, vessel etc without hindrance of large clumps.

As used herein, the term "grinding" refers to reducing particle size by impact, shearing, or attrition.

As used herein, the term "sample" is used in a broad sense including a specimen or culture obtained from any source, as well as biological and environmental samples. Biological samples may be obtained from animals (including humans) and encompass fluids, solids, tissues, and gases. Biological samples include blood products, such as plasma, serum and the like. Environmental samples include environmental material such as surface matter, soil, water, crystals and industrial samples.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

This invention relates to compositions comprising high lipid content algae and methods of making and utilizing the same. In particular, the invention relates to high lipid content algae biomass and algal lipid materials derived from the same, methods of making the same, as well as to biofuels (e.g., biodiesel) and dietary compositions (e.g., animal feeds) comprising or made from the same. Compositions and methods of the invention find use in a variety of applications including biofuel, dietary (e.g., human and animal nutrition), therapeutic as well as research applications.

Accordingly, in one aspect of the invention, there is provided a process for the preparation of an algal biomass containing elevated amounts (e.g., on a w/w basis) of total fat. For examples, as described herein, in some embodiments, the invention provides a method of generating an algal biomass containing a desired, high level of total fat content (e.g., greater than 60% total fat, in contrast to conventional methods that generate algal biomass containing a significantly lower level of total fat content (e.g., 60% or less total fat)). A great challenge of algal-based biofuel (e.g., biodiesel) is to ensure that the biomass is not made at the expense of more energy than is obtained in the final fuel product. Accordingly, in some embodiments, the invention provides a method of generating an algal biomass containing greater than 65% total fat. In some embodiments, the invention provides a method of generating an algal biomass containing greater than 66% total fat. In some embodiments, the invention provides a method of generating an algal biomass containing greater than 67% total fat. In some embodiments, the invention provides a method of generating an algal biomass containing greater than 68% total fat. In some embodiments, the invention provides a method of generating an algal biomass containing greater than 69% total fat. In some embodiments, the invention provides a method of generating an algal biomass containing greater than 70% total fat. In some embodiments, the invention provides a method of generating an algal biomass containing greater than 70% (e.g., greater than 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90% or more) total fat on a w/w basis.

In some embodiments, the method utilizes a closed bioreactor system (e.g., a fermentor), although the invention is not so limited (e.g., in some embodiments, open bioreactors may be utilized). In a preferred embodiment, growth of an algal biomass of the invention is conducted under aseptic conditions. In another preferred embodiment, algae are grown (e.g.,
5 to generate an algal biomass containing a high fat content (e.g., greater than 67% fat)) in a fed-batch process.

In some embodiments, the invention provides a method of culturing algae to produce an algal biomass comprising a desired, high total fat content (e.g., 67% or more total fat) as described in Examples 1 and 2. For example, in some embodiments, the invention provides a
10 method of culturing algae comprising culturing the algae in a stepwise manner so as to produce an algal biomass comprising a desired, high total fat content (e.g., 67% or more total fat). In some embodiments, a stepwise process for culturing algae comprises thawing a stored strain of algae and adding (e.g., aseptically) the thawed algae to a 1L shake flask contain medium comprising a carbon source (e.g., sugar (e.g., glucose)), yeast extract and sea
15 salt. In some embodiments, the carbon source is present in a concentration of 50 g/L, the yeast extract is present in a concentration of 10 g/L and/or the sea salt is present in a concentration of 4 g/L. In some embodiments, the 1L shake flask containing algae and medium are maintained at 30 C and shaken (e.g., at about 100-400 RPM) until such time that the algae have entered exponential growth phase but have not fully depleted the carbon
20 source (e.g., sugar (e.g., glucose)). Experiments conducted during development of embodiments of the invention have determined that the algae enter exponential growth but do not fully deplete the carbon source (e.g., sugar (e.g., glucose)) at a time period between 72-144 hours. Thus, in some embodiments, algae cultivated in a 1L culture flask at 30 C for 72-144 hours at about 100-400 RPM (e.g., 250 RPM) in medium comprising a carbon source
25 (e.g., sugar (e.g., glucose)), yeast extract and sea salt is used to inoculate a first seed stage culture (e.g., in a larger vessel (e.g., 40, 27 or 18 L vessel)). In some embodiments, the culture medium used in a first seed stage comprises a carbon source (e.g., sugar (e.g., glucose)), yeast extract, magnesium sulfate, calcium chloride and/or magnesium chloride. In a preferred embodiment, the culture medium used in a first seed stage comprises about 50 g/L
30 of a carbon source (e.g., sugar (e.g., glucose)), about 7.5 g/L yeast extract, about 0.15 g/L magnesium sulfate, about 0.15 g/L calcium chloride and/or 0.15 g/L magnesium chloride. In some embodiments, the first seed stage culture is run at 30 C under airflow and agitation conditions so as to maintain dissolved oxygen at about 7-15% (e.g., 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14%), although lower and higher dissolved oxygen conditions may be utilized. In a preferred

embodiment, the first seed stage culture is run at 30 C under airflow and agitation conditions so as to maintain dissolved oxygen at about 10%. In some embodiments, the first seed stage culture containing algae and medium are maintained at 30 C and cultivated until such time that the algae have entered exponential growth phase and at least 20 g/L of carbon source (e.g., sugar (e.g., glucose)) has been consumed but the carbon source has not been fully depleted. Experiments conducted during development of embodiments of the invention determined that the algae enter exponential growth, consume at least 20 g/L of carbon source (e.g., sugar (e.g., glucose)) but do not fully deplete the carbon source (e.g., sugar (e.g., glucose)) at a time period between 24-48 hours after inoculation of the first seed stage culture. In some embodiments, algae cultivated in first seed stage culture at 30 C for 24-48 hours in medium comprising a carbon source (e.g., sugar (e.g., glucose)), yeast extract, magnesium sulfate, calcium chloride and magnesium chloride are used to inoculate a second seed stage culture in yet a larger vessel (e.g., 2000 L vessel). In some embodiments, the culture medium used in a second seed stage culture comprises a carbon source (e.g., sugar (e.g., glucose)), yeast extract, magnesium sulfate, calcium chloride and/or magnesium chloride. In a preferred embodiment, the culture medium used in a second seed stage culture comprises about 50 g/L of a carbon source (e.g., sugar (e.g., glucose)), about 7.5 g/L yeast extract, about 0.15 g/L magnesium sulfate, about 0.15 g/L calcium chloride and/or 0.15 g/L magnesium chloride. In some embodiments, the second seed stage culture is run at 30 C under airflow and agitation conditions so as to maintain dissolved oxygen at about 7-15% (e.g., 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14%), although lower and higher dissolved oxygen conditions may be utilized. In a preferred embodiment, the second seed stage culture is run at 30 C under airflow and agitation conditions so as to maintain dissolved oxygen at about 10%. In some embodiments, the second seed stage culture containing algae and medium are maintained at 30 C and cultivated until such time that the algae have entered exponential growth phase, and at least 20 g/L of carbon source (e.g., sugar (e.g., glucose)) has been consumed, but the carbon source has not been fully depleted. Experiments conducted during development of embodiments of the invention determined that the algae enter exponential growth, consume at least 20 g/L of carbon source (e.g., sugar (e.g., glucose)) but do not fully deplete the carbon source (e.g., sugar (e.g., glucose)) at a time period between 24-48 hours after inoculation of the second seed stage culture. In some embodiments, algae cultivated in second seed stage culture at 30 C for 24-48 hours in medium comprising a carbon source (e.g., sugar (e.g., glucose)), yeast extract, magnesium sulfate, calcium chloride and magnesium chloride are used to inoculate a large scale vessel (e.g., 70,000 L, 120,000 L, 220,000 L or larger vessel

(e.g., a main fermentor)) containing medium used for further culturing/fermentation of the algae. In some embodiments, upon transfer of the second seed stage culture to the large scale vessel (e.g., main fermentor), the culture medium (e.g., the batched medium) present in the large scale vessel (e.g., main fermentor) comprises a carbon source (e.g., sugar (e.g., glucose)), yeast extract, magnesium sulfate, urea, calcium chloride, magnesium chloride and/or monopotassium phosphate. In a preferred embodiment, the culture medium used in a large scale (e.g., 70,000 L, 120,000 L, 220,000 L or larger vessel (e.g., main fermentor)) culture comprises about 50 g/L of a carbon source (e.g., sugar (e.g., glucose)), about 7.5 g/L yeast extract, about 4.0 g/L magnesium sulfate, about 1 g/L urea, about 2 g/L calcium chloride, about 2 g/L magnesium chloride and/or about 0.25 g/L monopotassium phosphate. In some embodiments, the large scale culture is run at 30 C under airflow and agitation conditions so as to maintain dissolved oxygen at about 7-15% (e.g., 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14%), although lower and higher dissolved oxygen conditions may be utilized. In a preferred embodiment, the large scale culture is run at 30 C under airflow and agitation conditions so as to maintain dissolved oxygen at about 10%. In a preferred embodiment, the carbon source (e.g., sugar (e.g., glucose)) is maintained at 10 g/L for a period of time (e.g., 1 or more days (e.g., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 or more days (e.g., using a fed-batch process)). For example, in some embodiments, after a desired amount of glucose has been consumed by algae in the large scale vessel (e.g., after about 20-30 g/L of glucose has been consumed by the algae in the large scale vessel (e.g., after 30 g/L of glucose has been consumed)), glucose and fed-batch feeds are started. Experiments conducted during development of embodiments of the invention determined that the fed-batch feeds be added for about 34 hours, although shorter (e.g., about 32, 28, 24, 20 hours or fewer) and longer (e.g., 36, 38, 42, 46, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144, 156, 168 hours or more) time periods may be used. In further preferred embodiments, upon completion of the fed-batch process, cultivation of the algae is continued in the large scale vessels until all nutrients are removed/consumed from the medium. Experiments conducted during development of embodiments of the invention determined that the nutrients are depleted from the medium between about 12 and 24 hours after cessation of the fed-batch process. In some embodiments, the algal biomass is harvested from the large scale culture medium/broth and utilized as described herein. In some embodiments, the large scale culture broth is centrifuged to obtain the algal biomass. In some embodiments, the large scale culture broth is cooled prior to centrifugation. Although an understanding of a mechanism is not needed to practice the invention, and the invention is not limited to any particular mechanism of action, in some embodiments, chilling the culture

broth increases the density of the algal biomass comprising elevated levels of total fat (e.g., lipids/oil) and allows a larger recovery of the biomass than is achieved in the absence of chilling the culture broth (See, e.g., Example 3). The invention is not limited by the temperature to which the large scale culture is chilled prior to centrifugation. In some
5 embodiments, the large scale culture is chilled to a temperature between 0-50 C, between 5-40 C, 5-25 C, 5-15 C or 5-10 C.

Thus, the invention utilizes both batch and fed-batch modes of culturing algae (e.g., alone and/or subsequent to a first and/or second seed stage) in order to generate an algal biomass that contains a desired fat content (e.g., a fat content greater than 67%). The
10 invention is not limited by the individual components present in the media used in either the batch or fed-batch modes. In some embodiments, culture media present at the time of inoculation of a main fermentor (e.g., 70,000 L, 120,000 L, 220,000 L vessel) contains medium with an initial ratio of nitrogen (N):phosphorus (P):potassium (K) of 46:13:8.5. In a preferred embodiment, the N:P:K ratio is the same in the batch and fed-batch culture modes.
15 In some embodiments, the ratio of magnesium (Mg):calcium (Ca) is 3:1 in culture media used in both batch and fed-batch modes. In another embodiment, the ratio of chloride (Cl⁻):sulfate (SO₄²⁻) is 1:1 in culture media used in both batch and fed-batch modes. In some embodiments, the ratio of sulfate (SO₄²⁻):phosphate (PO₄³⁻) in media at the time of inoculation of a main fermentor (e.g., 70,000 L, 120,000 L, 220,000 L vessel) is 16:1. In some
20 embodiments, the total ratio of sulfate (SO₄²⁻):phosphate (PO₄³⁻) that has been batched and fed at the end of a full culture (e.g., including inoculum, first seed stage, second seed stage and main fermentor cultures) that generates an algal biomass containing a desired fat content (e.g., greater than 67% fat) is 5.3:1. In some embodiments, the ratio of chloride (Cl⁻):phosphate (PO₄³⁻) in media at the time of inoculation of a main fermentor (e.g., 70,000
25 L, 120,000 L, 220,000 L vessel) is 16:1. In some embodiments, the total ratio of chloride (Cl⁻):phosphate (PO₄³⁻) that has been batched and fed at the end of a full culture (e.g., including inoculum, first seed stage, second seed stage and main fermentor cultures) that generates an algal biomass containing a desired fat content (e.g., greater than 67% fat) is 5.3:1.

30 As described in Example 2 below, the invention also provides a composition comprising an algal biomass (e.g., a dried algal biomass (e.g., generated according to a method described herein)) containing a desired amount of total fat and/or other components. For example, in some embodiments, the invention provides an algal biomass (e.g., a dried biomass) containing greater than 67% total fat (e.g., greater than about 68% total fat, greater

than about 69% total fat, greater than about 70% total fat, greater than about 71% total fat, greater than about 72% total fat, greater than about 73% total fat, greater than about 74% total fat, greater than about 75% total fat, greater than about 76% total fat, greater than about 77% total fat, greater than about 78% total fat or higher amount of total fat). In some
5 embodiments, an algal biomass (e.g., containing greater than 67% total fat) is dried such that the biomass contains less than 5% moisture (e.g., less than 4.5% moisture, less than 4% moisture, less than 3.5% moisture, less than 3% moisture, less than 2.5% moisture, less than 2% moisture, or less than 1.5% moisture). In some embodiments, an algal biomass of the invention (e.g., a dried biomass containing less than 5% moisture) contains about 170-250
10 mg/g or more docosahexaenoic acid (DHA) (e.g., about 170-180 mg/g DHA, about 180-190 mg/g DHA, about 190-200 mg/g DHA, about 200-210 mg/g DHA, about 210-220 mg/g DHA, about 220-230 mg/g DHA, about 230-240 mg/g DHA, about 240-250 mg/g DHA, or more than 250 mg/g DHA). In some embodiments, an algal biomass of the invention (e.g., a dried biomass containing less than 5% moisture) contains about 150-400 mg/g or more
15 palmitic acid (IUPAC name: hexadecanoic acid (e.g., about 150-200 mg/g, about 200-225 mg/g, about 225-250 mg/g, about 250-275 mg/g, about 275-300 mg/g, about 300-325 mg/g, about 325-350 mg/g, about 350-375 mg/g, about 375-400 mg/g, or more than 400 mg/g)). In some embodiments, an algal biomass of the invention (e.g., a dried biomass containing less than 5% moisture) contains about 300-600 mg/g or more total fatty acids (e.g., about 300-350
20 mg/g, about 350-400 mg/g, about 400-450 mg/g, about 450-500 mg/g, about 500-550 mg/g, about 550-600 mg/g, or more than 600 mg/g fatty acids)). In some embodiments, an algal biomass of the invention (e.g., a dried biomass containing less than 5% moisture) contains less than about 15% protein (e.g., less than about 14% protein, less than about 13% protein, less than about 12% protein, less than about 11% protein, less than about 10% protein, less
25 than about 9% protein, or less than about 8% protein).

The invention is not limited by the strain or species of algae utilized in the methods and compositions described herein. Indeed, a variety of algae find use in the invention including, but not limited to, one or more species of the genus *Thraustochytrium*. In some embodiments, the algae is a species of the genus *Chlorella*. In some embodiments, the algae
30 is a species of the genus *Schizochytrium*. In some embodiments, the algae is a species of the genus *Crypthecodinium*. In some embodiments, the algae is *Thraustochytrium striatum*, *Thraustochytrium roseum*, *Thraustochytrium aureum*, *Crypthecodinium cohnii*, and/or *Aurantiochytrium sp.* In a preferred embodiment, *Schizochytrium limacinum* is utilized in the methods and compositions described herein. The invention is not limited by the type of lipids

produced by a process to generate an algal biomass with elevated levels of lipids disclosed herein. In some embodiments, the lipids generated by a process of the invention include, but are not limited to, myristic acid, palmitic acid, oleic acid, linoleic acid, docosapentaenoic acid (DPA), docosahexaenoic acid (DHA), and stearic acid. These lipids have been useful for both animal and human health, for prevention of various diseases such as cardiovascular and inflammatory diseases and in infant nutrition for proper brain development and retinal vision in children.

In another embodiment, the invention provides a process for production of an algal biomass containing elevated levels (e.g., greater than 67%) of total fat from an algae species (e.g., *Schizochytrium limacinum*), wherein the process comprises culturing algae in a first feed batch vessel comprising medium (e.g., comprising about 50 g/L of a carbon source (e.g., sugar (e.g., glucose)), about 7.5 g/L yeast extract, about 0.15 g/L magnesium sulfate, about 0.15 g/L calcium chloride and/or 0.15 g/L magnesium chloride), transferring (e.g., aseptically) the first feed batch culture to a second seed batch culture medium (e.g., comprising about 50 g/L of a carbon source (e.g., sugar (e.g., glucose)), about 7.5 g/L yeast extract, about 0.15 g/L magnesium sulfate, about 0.15 g/L calcium chloride and/or 0.15 g/L magnesium chloride), transferring (e.g., aseptically) the second seed batch culture to a large scale culture vessel containing medium (e.g., a main fermentor (e.g., 70,000 L, 120,000 L, 220,000 L vessel, containing, for example, medium comprising about 50 g/L of a carbon source (e.g., sugar (e.g., glucose)), about 7.5 g/L yeast extract, about 4.0 g/L magnesium sulfate, about 1 g/L urea, about 2 g/L calcium chloride, about 2 g/L magnesium chloride and/or about 0.25 g/L monopotassium phosphate), wherein the glucose level of the large scale culture vessel is maintained at 10 g/L using a fed-batch process, wherein the algal cells are harvested from the large scale culture between 12-24 hours after cessation of the fed-batch process after all of the nutrients have been removed/consumed from the medium.

Another embodiment of the invention provides a process for production of an algal biomass containing elevated levels (e.g., greater than 67%) of total fat from an algae species (e.g., *Schizochytrium limacinum*), wherein the culture medium (e.g., during each stage of fermentation (e.g., first seed stage, second seed stage and/or batch culture (fed-batch) cultivation stage)) comprises a carbon source (e.g., a sugar), yeast extract, a phosphate source (e.g., monopotassium phosphate, magnesium sulfate and/or zinc sulfate), a nitrogen source (e.g., urea), magnesium chloride, and/or calcium chloride. In a preferred embodiment, the invention provides a process for production of an algal biomass containing elevated levels (e.g., greater than 67%) of total fat from a strain of algae wherein the culture medium (e.g.,

during each stage of fermentation (e.g., first seed stage, second seed stage and/or batch culture (fed-batch) cultivation stage)) comprises sugar, yeast extract, monopotassium phosphate, magnesium sulfate, zinc sulfate), urea, magnesium chloride, and/or calcium chloride. However, the invention is not limited by the type of nutrient utilized in a culture medium in which algae are grown. In some embodiments, one or more carbon sources are added to the medium. Examples of carbon sources include, but are not limited to, carbohydrates such as glucose, fructose, xylose, saccharose, maltose or soluble starch as well as oleic acid, fats such as soybean oil, molasses, glycerol, mannitol, and sodium acetate, cotton seed flour, glycerol, molasses and corn steep liquor. In some embodiments, one or more nitrogen sources are added to the medium. Examples of nitrogen sources include, but are not limited to, natural nitrogen sources such as peptone, yeast extract, malt extract, meat extract, casamino acid and corn steep liquor, organic nitrogen sources such as sodium glutamate and urea, or inorganic nitrogen sources such as ammonium acetate, ammonium sulfate, ammonium chloride, ammonium nitrate and sodium sulfate. In some embodiments, one or more phosphate sources are added to the medium. Examples of phosphate sources include, but are not limited to, potassium phosphate and potassium dihydrogen phosphate, inorganic salts, such as ammonium sulfate, sodium sulfate, magnesium sulfate, iron sulfate, zinc sulfate, and copper sulfate. In some embodiments, magnesium chloride, calcium chloride, and/or vitamins are included in the culture medium.

The invention is not limited by the amount (e.g., concentration) of each of these components in the culture medium. In some embodiments, an amount is utilized that is not harmful to algal growth. In a preferred embodiment, the amount (e.g., concentration and/or ratio) of each medium ingredient is set at a level (e.g., during each stage of fermentation (e.g., first seed stage, second seed stage and/or batch culture (fed-batch) cultivation stage) that promotes the formation of high fat content algae (e.g., an algal biomass comprising 67% or greater fat content). In some embodiments, the carbon source (e.g., sugar) is present in culture medium at about 20 to 120 grams per liter of medium. In other embodiments, the carbon source (e.g., sugar) is present in culture medium at about 30-70 grams per liter of medium. In still other embodiments, the carbon source (e.g., sugar) is present in culture medium at about 40 to 60 grams per liter of medium. In a preferred embodiment, the carbon source (e.g., sugar) is present in culture medium at about 50 grams per liter of medium. In some embodiments, the ratio of urea to monopotassium phosphate (urea:KH₂PO₄) is between about 5:0.1 (e.g., about 4.5:0.1; 4:0.25; 3:0.25; 4:0.3; 5:0.3; 5:0.5; 4:0.5; 3:0.5; 2:0.5; or 1:0.5); although higher and lower ratios may be used (e.g., 1:1, 1:2, 1:3 etc.). In a

preferred embodiment, the ratio of urea to monopotassium phosphate in culture medium is 4:1. In some embodiments, a culture medium does not contain sodium chloride. In other embodiments, a culture medium contains sodium chloride. In some embodiments, the ratio of magnesium sulfate (MgSO₄):calcium chloride (CaCl₂) is 1:1. In some embodiments, the ratio of magnesium sulfate (MgSO₄):calcium chloride (CaCl₂) is 1:2. Indeed, a variety of ratios of magnesium sulfate (MgSO₄):calcium chloride (CaCl₂) may be used including, but not limited to, 1:1; 1:1.125; 1:1.5; 1:1.75; 1:2; 1:2.125; 1:2.25; 1:2.5; 2.5:1; 2.25:1; 2.125:1; 2:1; 1.75:1; 1.5:1; 1.25:1 or 1.125:1. In a preferred embodiment, the ratio of magnesium sulfate (MgSO₄):calcium chloride (CaCl₂) in a first seed culture medium is 1:1. In another preferred embodiment, the ratio of magnesium sulfate (MgSO₄):calcium chloride (CaCl₂) in a second seed culture medium is 1:1. In yet another preferred embodiment, the ratio of magnesium sulfate (MgSO₄):calcium chloride (CaCl₂) in a large scale culture medium (e.g., main fermentor (e.g., 70,000 L, 120,000 L, 220,000 L vessel) also referred to as a third culture medium herein) is 1:2.

In a further preferred embodiment, after preparing the medium, the pH of the medium need not be adjusted. For example, during a stepwise fermentation process of the invention, the pH of the culture medium in which algae is grown need not be adjusted. Although an understanding of the mechanism is not necessary to practice the invention and the invention is not limited to any particular mechanism of action, in some embodiments, sterile and/or aseptic conditions of the stepwise fermentation process of the invention negates the need to adjust the pH of the culture medium during fermentation. In some embodiments, the pH of the culture medium is between 4.0 and 6.5. Cultivation of the algae during a stepwise fermentation process of the invention may be carried out at a temperature between 10 and 40 C., preferably 17 to 35 C, and most preferably around 30 C. Cultivation may be performed by aeration-agitation culture, shaking culture, stationary culture or the like. In a preferred embodiment, algae are cultured under conditions such that dissolved oxygen is maintained at or slightly above 10%.

In some embodiments, the invention provides a food, feed, nutritional or therapeutic supplement comprising all or a portion of an algal biomass (e.g., a dried algal biomass described herein and/or generated according to the methods and compositions described herein) comprising elevated levels (e.g., greater the 67%) of total fat. For example, in some embodiments, the invention provides a food, feed, nutritional or therapeutic supplement comprising a spray dried algal biomass comprising elevated levels (e.g., greater the 67%) of total fat. In other embodiments, the invention provides a food, feed, nutritional or therapeutic

supplement comprising lipids extracted and/or isolated from an algal biomass comprising elevated levels (e.g., greater than 67%) of total fat. The invention is not limited by the type of lipid extracted and/or isolated from an algal biomass comprising elevated levels (e.g., greater than 67%) of total fat. In some embodiments, the lipids comprise myristic acid, palmitic acid, oleic acid, linoleic acid, alpha-linolenic acid (ALA), stearidonic acid (SDA), eicosatrienoic acid, eicosatetraenoic acid, eicosapentaenoic acid (EPA), docosapentaenoic acid (DPA), clupanodonic acid, docosahexaenoic acid (DHA), tetracosapentaenoic acid, and/or tetracosahexaenoic acid. In a preferred embodiment, the lipids comprise DHA and/or palmitic acid.

10 In some embodiments, the invention provides a process for the preparation of lipids (e.g., those disclosed herein (e.g., docosahexaenoic acid)) comprising: culturing an algae strain (e.g., *Schizochytrium limacinum*) in a first culture medium (e.g., containing 50 g/L of a carbon source (e.g., sugar (e.g., glucose)), 10 g/L yeast extract and 4 g/L sea salt) and incubating the culture at a temperature in the range of 25-35 C for a period of about 72-144
15 hours; transferring the culture to a second culture medium (e.g., containing 50 g/L of a carbon source (e.g., sugar (e.g., glucose)), about 7.5 g/L yeast extract, about 0.15 g/L magnesium sulfate, about 0.15 g/L calcium chloride and/or 0.15 g/L magnesium chloride) and incubating the culture at a temperature in the range of 25-35 C for a period of about 24-48 hours; transferring the culture to a third culture medium (e.g., containing 50 g/L of a carbon source
20 (e.g., sugar (e.g., glucose)), about 7.5 g/L yeast extract, about 0.15 g/L magnesium sulfate, about 0.15 g/L calcium chloride and/or 0.15 g/L magnesium chloride) and incubating the culture at a temperature in the range of 25-35 C for a period of about 24-48 hours; transferring the culture to a fourth culture medium (e.g., containing 50 g/L of a carbon source (e.g., sugar (e.g., glucose)), about 7.5 g/L yeast extract, about 4.0 g/L magnesium sulfate,
25 about 1 g/L urea, about 2 g/L calcium chloride, about 2 g/L magnesium chloride and/or about 0.25 g/L monopotassium phosphate) and incubating the culture at a temperature in the range of 25-35 C (e.g., 30 C) for a time period of about 24-192 hours (e.g., about 36, about 38, about 42, about 46, about 60, about 72, about 84, about 96, about 108, about 120, about 132, about 144, about 156, about 168, about 180 or about 192 hours); separating the cell biomass
30 from the culture; and extracting lipids from the biomass.

In some embodiments, algae cultures (e.g., grown to produce an algal biomass) are grown in suitable volumes and vessels, ranging from 100 ml to hundreds of thousands of liters, in flasks or large fermentors, using various nutrient media as described herein.

In yet another aspect, the separation of the cell biomass containing lipids is obtained

using centrifugation, filtration and/or flocculation or similar techniques. In a preferred embodiment, an algal biomass is obtained from a culture using centrifugation. In a further preferred embodiment, centrifugation occurs after the cell culture is cooled (e.g., to allow recovery of cells containing elevated levels of lipid). In some embodiments, an algal biomass
5 obtained is spray-dried and used (e.g., directly used in animal feeds or for biofuel production).

In one embodiment, the algae is a mixture of different algae species (e.g., one or more of the species of algae described herein). In some embodiments, an algal biomass containing elevated levels of total fat and/or lipids extracted from an algal biomass containing elevated
10 levels of total fat is supplemented with lipids (e.g., polyunsaturated fatty acids) from other sources including, but not limited to, plant sources.

In some embodiments, an algal biomass containing elevated levels of total fat comprise lipids at a concentration (w/w) in a range from about 60-90% (e.g., about 65-90%, about 66-89%, about 67-88%, about 68-87%, about 68-86%, about 69-85%, or about 70-
15 80%). Thus, an algal biomass containing elevated levels of lipids may comprise lipids at a concentration of 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90% and the like. In one embodiment, an algal biomass containing elevated levels of total fat comprise lipids at a concentration of at least 67%.

In some embodiments, DHA is included in an algal biomass composition of the invention in a range from 1% to 75% of total lipids/fatty acids. Thus, the DHA can be provided in the composition in an amount of total fatty acids of 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, about 35%, about 40%, about 45%, about
25 50%, about 55%, about 60%, about 65%, about 70%, about 75%, and the like. In other embodiments, the DHA can be included in a composition in an amount of total fatty acids in a range from 1% to 5%, 1% to 10%, 1% to 15%, 1% to 20%, 1% to 25%, 1% to 30%, 5% to 10%, 5% to 15%, 5% to 20%, 5% to 25%, 5% to 30%, 10% to 15%, 10% to 20%, 10% to 25%, 10% to 30%, 15% to 20%, 15% to 25%, 15% to 30%, 20% to 25%, 20% to 30%, 25%
30 to 30%, 30% to 35%, 35% to 40%, 40% to 45%, 45% to 50%, 50% to 55%, 55% to 60%, 60% to 65%, 65% to 70%, 70% to 75%, and the like.

In some embodiments, palmitic acid is included in an algal biomass composition of the invention in a range from 1% to 75% of total lipids/fatty acids. Thus, the palmitic acid can be provided in the composition in an amount of total fatty acids of 1%, 2%, 3%, 4%, 5%,

6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, about 35%, about 40%, about 45%, about 50%, about 55%, about 60%, about 65%, about 70%, about 75%, and the like. In other embodiments, the palmitic acid can be included in a composition in an amount of total fatty acids in a range from 1% to 5%, 1% to 10%, 1% to 15%, 1% to 20%, 1% to 25%, 1% to 30%, 5% to 10%, 5% to 15%, 5% to 20%, 5% to 25%, 5% to 30%, 10% to 15%, 10% to 20%, 10% to 25%, 10% to 30%, 15% to 20%, 15% to 25%, 15% to 30%, 20% to 25%, 20% to 30%, 25% to 30%, 30% to 35%, 35% to 40%, 40% to 45%, 45% to 50%, 50% to 55%, 55% to 60%, 60% to 65%, 65% to 70%, 70% to 75%, and the like.

Additional embodiments of the invention include processes of making animal feed additives. Thus, one aspect of the present invention is a process of making an animal feed additive comprising lipids from an algae (e.g., an algal biomass), the process comprising: cultivating algae to produce a algae biomass containing a desired, elevated level of total fat (e.g., greater than 67% total fat); and extracting algae lipid from the algae biomass to produce a algae oil; and/or removing water from algae biomass to produce a algae biomass with a solids content from about 5% to 100% weight percent; wherein the animal feed additive comprises lipids from the algae. In some embodiments, the fatty acids collected from the algae are short chain, medium or long chain omega-3 fatty acids. In further embodiments, the algae lipid extracted from the algae biomass is combined with a algae biomass with a solids content from about 5% to 100% weight percent.

A feed additive according to the invention can be combined with other food components to produce processed food or feed products (e.g., animal and/or human feed products). Such other food components include one or more enzyme supplements, vitamin food additives and mineral food additives. The resulting (combined) feed additive may be mixed in an appropriate amount with the other food components such as cereal and plant proteins to form a processed food product. Processing of these components into a processed food product can be performed using any conventionally used processing apparatuses. Feed/food additives of the present invention may be used as a supplement in a food/feed by itself, in addition with vitamins, minerals, other feed enzymes, agricultural co-products (e.g., wheat middlings or corn gluten meal), or in a combination therewith.

In a further aspect, the invention provides a process of producing an animal and/or human having an increased tissue content of omega-3 fatty acids, the process comprising feeding to an animal/human a feed additive comprising lipids/fatty acids collected from algae, the feed additive further comprising: (a) an algae lipid extracted from a cultivated

algae biomass and/or (b) a algae biomass from a cultivated algae, wherein water is removed from algae biomass to achieve a solids content from about 5 to 100% weight percent, wherein the animal/human displays increased tissue content of omega-3 fatty acids. The invention is not limited to any particular mammal (e.g., animal or human) that may benefit from a composition of the invention. Indeed, animals of the invention include, but are not limited to, any animal whose eggs, meat, milk or other products are consumed by humans or other animals. Thus, animals of the invention include, but are not limited to, fish, poultry (chickens, turkeys, ducks, etc.), pigs, sheep, goats, rabbits, beef and dairy cattle.

In some embodiments, the invention provides a method for treating a mammalian disease in a subject in need thereof by administration to the subject a therapeutically effective amount of a composition of the invention. In some embodiments, a mammalian disease that is treated includes, but is not limited to, a cardiovascular disease, an inflammatory disease, and various cancer diseases. In other embodiments, the cardiovascular diseases to be treated include, but are not limited to, hypertriglyceridemia, coronary heart disease, stroke, acute myocardial infarction and atherosclerosis. In further embodiments, the inflammatory diseases to be treated include, but are not limited to, asthma, arthritis, allergic rhinitis, psoriasis, atopic dermatitis, inflammatory bowel diseases, Crohn's disease, and allergic rhinoconjunctivitis. In still further embodiments, the cancer diseases to be treated include, but are not limited to, prostate cancer, breast cancer and colon cancer. In additional embodiments, the mammalian diseases to be treated include psychiatric disorders. Psychiatric disorders include, but are not limited to, depression, bipolar disorder, schizophrenia. In addition, the compositions of the invention can be used to maintain and/or enhance cognitive function.

In some embodiments, the invention provides a method of treating a mammalian disease in a subject in need thereof by administration to the subject a therapeutically effective amount of a lipid composition provided by and/or obtained from an algal biomass containing an elevated level of total fat (e.g., greater than 67% total fat). Subjects that may find benefit from treatment include but are not limited to, avian and mammalian subjects. Mammals of the present invention include, but are not limited to, canines, felines, bovines, caprines, equines, ovines, porcines, rodents (e.g. rats and mice), lagomorphs, primates (including non-human primates), humans, and the like, and mammals in utero. Any mammalian subject in need of being treated according to the present invention is suitable. Mammals of the present invention include, but are not limited to, canines, felines, bovines, caprines, equines, ovines, porcines, rodents (e.g. rats and mice), lagomorphs, primates (including non-human primates),

humans, and the like, and mammals in utero. According to some embodiments of the present invention, the mammal is a non-human mammal. In some embodiments, the mammal is a human subject. Mammalian subjects of both genders and at any stage of development (e.g., neonate, infant, juvenile, adolescent, adult) can be treated according to the present invention.

5 Illustrative avians according to the present invention include chickens, ducks, turkeys, geese, quail, pheasant, ratites (e.g., ostrich), domesticated birds (e.g., parrots and canaries), and birds in ovo.

Algae

10 Any algae capable of producing, using the processes described herein, elevated levels of total fat or algal biomass containing elevated levels of total fat can be used in the processes, compositions, dietary supplements, biofuel and/or biofuel precursor and/or feed additives of the invention. Thus, in some embodiments, the algae of the present invention is selected from *Thraustochytrium*, *Dinophyceae*, *Cryptophyceae*, *Trebouxiophyceae*,
15 *Pinguicophyceae*, and combinations thereof. In other embodiments, the algae of the invention are selected from *Thraustochytrium striatum*, *Thraustochytrium roseum*, *Thraustochytrium aureum*, *Cryptocodinium cohnii*, *Parietochloris* spp., *Rhodomonas* spp., *Cryptomonas* spp., *Parietochloris* spp., *Hemisebnis* spp., *Porphyridium* spp., *Glossomastix* spp., and combinations thereof. In further embodiments, the algae of the invention are selected from
20 *Parietochloris incisae*, *Rhodomonas salina*, *Hemiselmis brunescens*, *Porphyridium cruentum* and *Glossomastix chrysoplata*, and combinations thereof. In still further embodiments, the algae of the invention is *Schizochytrium limacinum*.

In some embodiments of the invention, the algae is a mixture of different algae species. In other embodiments, the algae is a single algae species. In some embodiments of
25 the present invention, the algae lipids/fatty acids are provided as an algal oil. In other embodiments, the algae lipids/fatty acids are provided as an algal biomass (e.g., a dried (e.g., powdered) biomass).

Further, the algae of the invention include, but are not limited to, wild-type, mutant (naturally or induced) or genetically engineered algae. In a preferred embodiment, an algae
30 used in the processes, compositions, dietary supplements, biofuel or biofuel precursor and/or feed additives of the invention is a non-genetically modified organism. As used herein, the terms "genetically modified variant," and "genetically modified organism" refer to an algae strain that has a genome which is modified (e.g., mutated, changed) from its normal (e.g., wild-type, naturally occurring) form such that a desired result is achieved.

Additionally, the algae of the invention includes algae having cells with cell walls of reduced thickness as compared to the cells of wild-type algae, whereby the cell wall of reduced thickness improves extractability and/or bioavailability of the algae lipid fraction (e.g., improving the ease of digestibility of the algae and the ease of extractability of the algae lipids/fatty acids from the cells of the algal biomass). Algae having cells with cell walls of reduced thickness as compared to the cells of wild-type algae can be naturally occurring, mutated and/or genetically engineered to have cell walls of reduced thickness as compared to wild-type strains. Thus, in one embodiment of the invention the algae is an algae having a cell wall of reduced thickness as compared to the wild-type algae, whereby the cell wall of reduced thickness improves extractability and/or bioavailability of the algae lipid fraction. Methods of producing algae with reduced cell walls include those found in WO 2006/107736 A1, herein incorporated by reference in its entirety. Thus, the algae can be mutagenized with mutagens known to those of skill in the art including, but not limited to, chemical agents or radiation. In particular embodiments the chemical mutagens include, but are not limited to, ethyl methanesulfonate (EMS), methylmethane sulfonate (MMS), N-ethyl-N-nitrosourea (ENU), triethylmelamine (TEM), N-methyl-N-nitrosourea (MNU), procarbazine, chlorambucil, cyclophosphamide, diethyl sulfate, acrylamide monomer, melphalan, nitrogen mustard, vincristine, dimethylnitrosamine, N-methyl-N'-nitro-Nitrosoguanidine (MNNG), nitrosoguanidine, 2-aminopurine, 7,12 dimethyl-benz(a)anthracene (DMBA), ethylene oxide, hexamethylphosphoramide, bisulfan, diepoxyalkanes (diepoxyoctane (DEO), diepoxybutane (BEB), and the like), 2-methoxy-6-chloro-9(3-(ethyl-2-chloro-o-ethypaminopropylamino)acridine dihydrochloride (ICR-170), formaldehyde, and the like. Methods of radiation mutagenesis include, but are not limited to, x-rays, gamma-radiation, ultra-violet light, and the like.

Cell wall mutants can be selected for on the basis of increased sensitivity to detergents or by microscopic observation of alterations in cell wall thickness (See, e.g., WO 2006/107736 A1) or any other method known in the art to detect reduced cell wall thickness or reduced cell wall integrity.

The algae of the invention can be cultured according to techniques described in Examples 1-3.

Accordingly, in some embodiments the algae are cultured at a temperature in a range from 10°C to 35°C. Thus, the algae can be cultured at a temperature of 10°C, 11°C, 12°C, 13°C, 14°C, 15°C, 16°C, 17°C, 18°C, 19°C, 20°C, 21°C, 22°C, 23°C, 24°C, 25°C, 26°C, 27°C, 28°C, 29°C, 30°C, 31°C, 32°C, 33°C, 34°C, and the like. In other embodiments, the algae can

be grown in ranges from 20°C to 35°C, although colder (e.g., less than 20°C) and warmer (e.g., more than 35°C) may be used. In a preferred embodiment, the algae are grown at about 30°C.

In some embodiments, following cultivation, algae are harvested. In some
5 embodiments, harvesting of algae is performed using conventional procedures known to those of skill in the art including, but not limited to, centrifugation, flocculation or filtration. In a preferred embodiment, prior to harvesting, the algae culture is cooled, thereby allowing algal cells containing elevated levels of total fat to be successfully harvested. The harvested algal cells or algal biomass can then be used directly as a lipid/fatty acid source or extracted
10 to obtain algal oil comprising the lipids/fatty acids. In some embodiments in which the algal biomass is to be used directly, water is removed from the algal biomass to achieve a solids content from about 5 to 100 weight percent. In additional embodiments, an algal biomass that is to be used directly is comprised of algal cells further comprising cell walls that are at least partially disrupted to increase the extractability and/or bioavailability of the algal oil
15 within the cells. The disruption of the algal cells can be carried out according to known techniques including, but not limited to, treating the cells with boiling water or by mechanical breaking such as grinding, pulverizing, sonication, French press, or any other method known to an ordinary artisan.

When the algal biomass is used directly, water is removed from the algal biomass to
20 achieve a solids content from about 5 to 100%. Accordingly, in some embodiments, water is removed from the algal biomass to achieve a solids content of about 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, and the like. In
25 additional embodiments, water is removed from the algal biomass to achieve a solids content in the range from about 5% to 50%, 5% to 60%, 5% to 70%, 5% to 80%, 5% to 90%, 5% to 95%, 10% to 30%, 10% to 40%, 10% to 50%, 10% to 60%, 10% to 65%, 10% to 70%, 10% to 75%, 10% to 80%, 10% to 85%, 10% to 90%, 10% to 95%, 10% to 100%, 15% to 40%, 15% to 50%, 15% to 60%, 15% to 65%, 15% to 70%, 15% to 75%, 15% to 80%, 15% to 85%,
30 15% to 90%, 15% to 95%, 15% to 100%, 20% to 50%, 20% to 60%, 20% to 65%, 20% to 70%, 20% to 75%, 20% to 80%, 20% to 85%, 20% to 90%, 20% to 95%, 20% to 100%, 25% to 50%, 25% to 60%, 25% to 70%, 25% to 75%, 25% to 80%, 25% to 85%, 25% to 90%, 25% to 95%, 25% to 100%, 30% to 50%, 30% to 60%, 30% to 70%, 30% to 75%, 30% to 80%, 30% to 85%, 30% to 90%, 30% to 95%, 45% to 100%, 50% to 70%, 50% to 75%, 50%

to 80%, 50% to 85%, 50% to 90%, 50% to 95%, 50% to 100%, 55% to 75%, 55% to 80%, 55% to 85%, 55% to 90%, 55% to 95%, 55% to 100%, 60% to 75%, 60% to 80%, 60% to 85%, 60% to 90%, 60% to 95%, 60% to 100%, 70% to 80%, 70% to 85%, 70% to 90%, 70% to 95%, 70% to 100%, 75% to 85%, 75% to 90%, 75% to 95%, 75% to 100%, 80% to 85%, 80% to 90%, 80% to 95%, 80% to 100%, 85% to 90%, 85% to 95%, 85% to 100%, 90% to 95%, 95% to 100%, and the like.

In some embodiments, the algal cells of the biomass are disrupted or lysed and the algal lipids extracted. The algal cells can be extracted wet or dry according to conventional techniques to produce a composition containing lipids/fatty acids. The disruption or lysis of the algal cells can be carried out according to conventional techniques including, but not limited to, treating the cells with boiling water or by mechanical breaking such as grinding, pulverizing, sonication, French press, or any other known method. Extraction of the lipids/fatty acids from the lysed cells follow standard procedures used with algal and other organisms that are known including, but not limited to, separating the liquid phase from the solid phase following cell lysis, extracting the lipids/fatty acids in the liquid phase by the addition of a solvent, evaporating the solvent, and recovering the lipids/fatty acids obtained from the liquid phase of the lysed cells.

The invention is not limited to any particular solvent used for extraction. Solvents include, but are not limited to, hexane, chloroform, ethanol, methanol, isopropanol, diethyl ether, dioxan, isopropyl ether, dichloromethane, tetrahydrofuran, petroleum ether and combinations thereof.

In some embodiments, lipids/fatty acids derived from an algal biomass of the invention are provided in the form of free fatty acids, cholesterol esters, salt esters, fatty acid esters, monoglycerides, diglycerides, triglycerides, diacylglycerols, monoglycerols, sphingophospholipids, sphingoglycolipids, or any combination thereof (e.g., for use in processes, compositions, biofuels, food products, dietary supplements, feed additives or other compositions described herein).

Method for Preparing An Algal Biomass

In some embodiments, the invention provides a method for preparing a algal biomass comprising elevated levels of total fat (e.g., greater than 67% lipids), comprising: culturing algae under a culture condition sufficient to provide an algal biomass comprising elevated levels of total fat (e.g., greater than 67% lipids), wherein the algal biomass is harvested at the termination of a logarithmic growth phase of the algae (See, e.g., Examples 1 and 2). As

used herein, the term "logarithmic growth phase," refers to a stage of culturing characterized by exponentially increasing numbers of algal cells. Generally, in a culture system, there is a characteristic growth pattern following inoculation that includes a lag phase, an exponential or "logarithmic growth phase," a negative growth acceleration phase, and a plateau or "stationary phase." For example, in the logarithmic growth phase, as growth of the algae continues, cells can reach their maximum rate of cell division and numbers of cells increase in log relationship to time. Within time after the commencement of the log phase, the rate of cell division may begin to decline and some of the cells can begin to die. This is reflected on a growth curve by a gradual flattening out of the line. Eventually the rate of cells dying is essentially equal to the rate of cells dividing, and the total viable population can remain the same for a period of time. This is known as the stationary or plateau phase and is represented on a growth curve as a flattening out of the line where the slope approaches zero. In a preferred embodiment, the algal biomass is cultured under aseptic conditions (e.g., to prevent contamination and/or growth of contaminating microorganisms (e.g., yeast, bacteria, virus, etc.) in the culture).

In some embodiments, the culture condition is sufficient for the algae to produce elevated levels of total fat (e.g., greater than 67% on a w/w basis). The culture conditions comprise a culture medium suitable for growing the algae thereby providing the algae biomass comprising elevated levels of total fat (e.g., greater than 67% on a w/w basis). Suitable culture mediums are described herein. The medium may also comprise salts, vitamins, minerals, metals, and other nutrients. Preferably, the culture condition is sufficient to provide a suitable amount of nutrient and temperature for the algae to grow under conditions that generate an algal biomass comprising elevated levels of total fat.

In some embodiments, culturing comprises limiting a nutrient (e.g., nitrogen, phosphorous) for a suitable time to increase the amount total fat. For example, the culture can be starved of a certain nutrient or transferred to a separate culturing medium lacking a specific nutrient (e.g., phosphorus-free or nitrogen-free medium, or a culture medium containing lower levels of a nutrient). In some embodiments, the culture medium contains an initial content of a nutrient such that that nutrient becomes depleted at a later time during exponential growth but prior to the depletion of other nutrients. In some embodiments, culturing does not comprise limiting a nutrient (e.g., nitrogen, phosphorous) during culture. In some embodiments, culturing of a single algal biomass takes place in two or more types of medium in a sequential manner. In some embodiments, culturing of a single algal biomass takes place in three or more types of medium in a sequential manner. In like manner,

culturing of a single algal biomass may take place in two or more vessels, wherein a first vessel is used to inoculate a subsequent vessel, the subsequent vessel is used to inoculate yet another subsequent vessel, and so on. Although an understanding of a mechanism is not needed to practice the invention, and the invention is not limited to any particular mechanism of action, in some embodiments, sequential culturing of a single algal biomass in multiple vessels containing multiple types of medium allows the algal biomass to grow in such a way that the total fat content of the biomass is elevated compared to growth of an algal biomass (e.g., of the same algal species) grown in a single vessel and/or growth medium.

Culturing of the algae can be performed in a conventional bioreactor suitable for culturing the algae to provide an algae biomass. For example, the algae can be cultured by a process including, but not limited to, batch, fed-batch, cell recycle, and continuous fermentation. In a preferred embodiment, the algae are cultured in a fed-batch process.

The invention is not limited to any particular manner or method of harvesting the algae from the culture medium. A variety of methods can be used to harvest the algal cells from the culture medium. In one embodiment, harvesting comprises recovering the algal biomass from the culture medium by separating, for example by filtration (e.g., belt filtration, rotary drum filtration) and/or centrifugation. If desired, the harvested algal cells can then be washed, frozen, lyophilized, spray dried, and/or stored under a non-oxidizing atmosphere of a gas (e.g., CO₂, N₂) to reduce or eliminate the presence of O₂. Optionally, synthetic and/or natural antioxidants including, but not limited to, butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxyanisole (BHA), tert-butylhydroquinone (TBHQ), ethoxyquin, beta-carotene, vitamin E, and vitamin C also can be added to the harvested cells.

In some embodiments, the invention provides a method for preparing an algal biomass comprising elevated levels of total fat, the method comprising: culturing algae under a culture condition sufficient to provide an algal biomass comprising elevated levels of total fat and harvesting the algal biomass.

Microalgae Biomass

The invention provides, in some embodiments, an algal biomass and/or a fraction and/or an extract thereof (e.g., for use in biofuel production and/or as a food or feed product).

In some embodiments, the algal biomass comprises an omega-3 fatty acid content of at least 10% dry weight of the biomass, illustratively, about 10% to about 50%, about 10% to about 40%, about 10% to about 30%, about 10% to about 20% dry weight of the biomass. In one embodiment, the algal biomass is prepared in accordance with the methods of the

invention. For example, in some embodiments, the algal biomass is prepared by a method comprising: culturing an algae under a culture condition sufficient to provide a algal biomass comprising elevated total fat levels (e.g., greater than 67% w/w), wherein the algal biomass is harvested at a negative growth acceleration phase or a stationary phase. In another
5 embodiment, the algal biomass is harvested from the culture during the exponential, logarithmic growth phase.

Lipid Compositions Prepared From Algal Biomass

In some embodiments, the invention provides a method for preparing a lipid/fatty acid
10 extract (e.g., a lipid/fatty acid composition) from an algal biomass grown under conditions to contain elevated levels of total fat, the method comprising obtaining lipids from an algal biomass cultured under a culture condition sufficient to provide an algal biomass with elevated total fat content (e.g., total fat content greater than 67% of the biomass), wherein the algal biomass is harvested at a negative growth acceleration phase or a stationary phase of the
15 algae. In another embodiment, the algal biomass is harvested during a logarithmic growth phase of the algae.

Methods for obtaining a lipid composition from an algal biomass of the invention include, but are not limited to, extraction, heat, pressure, saponification, sonication, freezing, grinding, ion exchange, chromatography, membrane separation, electrodialysis, reverse
20 osmosis, distillation, chemical derivatization, crystallization, etc. For example, algal lipids can be extracted from the algal cells by any suitable method including, but not limited to, extraction with a solvent including, but not limited to, ethanol, ethyl acetate, isopropyl alcohol, methanol, ethyl acetate, hexane, methylene chloride, methanol, petroleum, chloroform, and the like, or by pressurized liquid hydrocarbons such as butane, pentane,
25 propane, or others (with or without co-solvents), or through supercritical fluid extraction (with or without co-solvents). Optionally, the extracted lipid/fatty acid oil are evaporated under reduced pressure to reduce or remove the solvent and/or produce a sample of concentrated lipid material. In other embodiments, the cells are broken or lysed to obtain the lipid composition, for example into an oil form (e.g., for use as a biofuel or a biofuel
30 precursor). In some embodiments, the extracted oils are subjected to refining. The invention is not limited by the type of refining. In some embodiments, the extracted oils are chemically refined. In some embodiments, the extracted oils are physically refined. In some embodiments, the extracted oils are both chemically and physically refined. Extracted oils (e.g., from an algal biomass grown under conditions to elevate the total fat content of the

algal cell (e.g., to above 67%)) may be refined using any conventional refining method. The refining process may remove some or all impurities from the extracted lipids/fatty acids/oils. In some embodiments, the refining process comprises one or more steps to degum, bleach, filter, deodorize and/or polish the extracted lipids/fatty acids/oils.

5 In some embodiments, the lipids/fatty acids/oils contained in the extracted lipid composition is concentrated by hydrolyzing the lipids to concentrate the lipid fraction by employing a method such as, for example, urea adduction, fractional distillation, column chromatography, and/or supercritical fluid fractionation.

 Accordingly, in one embodiment, the step of obtaining a lipid composition from an
10 algal biomass of the invention comprises extracting the lipid composition from the biomass. In another embodiment, the step of obtaining a lipid composition from an algal biomass of the invention comprises contacting the biomass with a polar solvent.

 For example, in some embodiments, lipid/fatty acid/oil is extracted from the algal biomass to provide a lipid composition using a solvent under an extraction condition
15 sufficient to extract lipids and/or fatty acids but not sufficient to extract compounds that are insoluble in the solvent. In one embodiment, a lipid/fatty acid composition is extracted from an algal biomass of the invention wherein cellular debris and/or precipitated insoluble compounds are separated from the fraction containing lipid/fatty acid and solvent. In another embodiment, the method further comprises separating the cellular debris and precipitated
20 compounds using a separation method such as filtration, centrifugation, and/or combinations thereof. In some embodiments, the cellular debris and/or precipitated insoluble compounds (e.g., that portion of the algal biomass that are not soluble in a solvent (e.g., proteins, fiber, etc.) are recovered and utilized (e.g., in a food or feed product).

 In some embodiments, the solvent is a polar solvent. Examples of polar solvents
25 include, but are not limited to, ethanol, ethyl acetate, isopropyl alcohol, methanol, ethyl acetate, and mixtures thereof. In one embodiment, the polar solvent is ethanol. Extraction of the lipid composition with a solvent can be carried out in a variety of ways. For example, the extraction can be a batch process, a continuous process, or a continuous counter-current process. In a continuous counter-current process, the solvent contact with the microalgae
30 leaches the oil into the solvent, providing an increasingly more solvent-oil fraction. Following extraction, the solvent can be removed using methods known in the art. For example, distillation, rotary evaporation, or a rising film evaporator and steam stripper or any suitable desolventizer can be used for removing the solvent.

 In one embodiment, the extracted lipids/fatty acids are exposed to an absorption

process (e.g., bleaching) to remove one or more undesirable compounds such as, for example, color bodies and/or phosphatides that may be present. In some embodiments, the absorption process is a bleaching process comprising contacting the lipid/fatty acid extract with a bleaching material (e.g., neutral earth (e.g., natural clay or fuller's earth), acid-activated earth, activated carbon, activated clays, silicates, and or a combination thereof). The invention is not limited by the amount of bleaching material utilized.

In one embodiment, the extracted lipids/fatty acids are exposed to a degumming step. Degumming methods are known in the art and include, for example, water degumming, acid degumming, enzymatic degumming, and membrane degumming. In some embodiments, the lipid/fatty acid extract is subjected to degumming (e.g., following an absorption process), wherein the degumming comprises contacting the lipid/fatty acid extract with a mixture of aqueous acids that are in amounts effective to precipitate gums and/or chlorophyll-type compounds that may be present in the lipid/fatty acid extract composition. The invention is not limited by the type or amount of aqueous acids utilized. In one embodiment, the mixture of aqueous acids comprises sulfuric acid and/or phosphoric acid. In another embodiment, equal amounts of aqueous acids are mixed with the lipid composition. In a preferred embodiment, when blended with the oil, the aqueous acids are in an amount sufficient to provide an acidic pH. Precipitates that form after acid mixing can be removed from the lipid composition, for example using centrifugation and/or filtration (e.g., membrane filtration). In some embodiments, the degummed lipid/fatty acid extract composition is subjected to drying (e.g., to reduce moisture content of the composition). The invention is not limited by the drying condition (e.g., time, temperature, and/or a vacuum condition). As described herein, in some embodiments, the moisture content of the dried lipid/fatty acid composition is less than about 10% w/w (e.g., less than about 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1, 0.05, or 0.01% w/w).

Lipid Composition

In some embodiments, the invention provides a lipid composition prepared from a algal biomass of the invention. In some embodiments, the lipid composition is prepared in accordance with a method of the invention. For example, in some embodiments, a lipid composition is an algal biomass or a portion/fraction thereof from algae of the genus *Thraustochytrium*. In some embodiments, the algal biomass comprises an algae selected from *Dinophyceae*, *Cryptophyceae*, *Trebouxiophyceae*, *Pinguicophyceae*, and/or combinations thereof. In other embodiments, the algal biomass comprises an algae selected from

Thraustochytrium striatum, *Thraustochytrium roseum*, *Thraustochytrium aureum*,
Cryptocodinium cohnii, *Parietochloris* spp., *Rhodomonas* spp., *Cryptomonas* spp.,
Parietochloris spp., *Hemisebnis* spp.; *Porphyridium* spp., *Glossomastix* spp., and/or
combinations thereof. In further embodiments, the algal biomass comprises an algae selected
5 from *Parietochloris* *incise*, *Rhodomonas* *salina*, *Hemiselms* *brunescens*, *Porphyridium*
cruentum and *Glossomastix* *chrysoplata*, and combinations thereof. In a preferred
embodiment, the algal biomass comprises *Schizochytrium* *limacinum*.

Food Products and Animal Feed Additives

10 In some embodiments, a whole-cell algal biomass, fraction, and/or extract thereof is
used for consumption (e.g., by a mammal (e.g., human or animal consumption)) or as a food
additive (e.g., to increase the lipid content and/or nutritional components of a food). For
example, in some embodiments, when used as animal feed (e.g., cattle feed, dairy feed,
aquaculture feed, poultry feed, etc.), the lipids/fatty acids produced by an algal biomass of the
15 invention is incorporated into a food product (e.g., animal feed). In some embodiments, a
whole-cell algal biomass, fraction, and/or extract thereof is used for pharmaceutical or
nutritional purposes and/or industrial applications.

The whole-cell algal biomass, fraction, and/or extract thereof can be provided in any
one of variety of forms/compositions suitable for a particular application or use. In some
20 embodiments, the whole-cell algal biomass, fraction, and/or extract thereof is provided. In
another embodiment, a whole-cell algal biomass, fraction, and/or extract thereof is provided
in a powdered form or as a free oil in a liquid form (e.g., lipid composition or a fraction or
concentrate thereof). A whole-cell algal biomass, fraction, and/or extract thereof may be
used for human and/or animal consumption. For example, in some embodiments, a whole-
25 cell algal biomass, fraction, and/or extract thereof is provided as or incorporated into a feed, a
dietary supplement, a food, a pharmaceutical formulation, a dairy product, and/or an infant
formula.

For example, in one embodiment, a whole-cell algal biomass, fraction, and/or extract
thereof is dried (e.g., spray drying, tunnel drying, vacuum drying) and used as a feed or food
30 supplement for any animal or aquaculture organism (e.g., fish, shrimp, crab, lobster, etc.)
whose meat and/or products are consumed by humans or animals (e.g., pets, livestock). In
another embodiment, a whole-cell algal biomass, fraction, and/or extract thereof is mixed
with a dry moisture-reducing agent (e.g., ground grain such as ground corn).

The compositions described herein may be used as a complete food product, as a

component of a food product, as a dietary supplement or as part of a dietary supplement, as a feed additive and may be either in liquid, semisolid or solid form. The compositions of the invention additionally may be in the form of a pharmaceutical composition. The compositions, dietary supplements, food products, baby food products, feed additives, and/or pharmaceutical compositions of the invention may be utilized in methods for promoting the health of an individual. The compositions may be in liquid, semisolid or solid form. For example, the compositions may be administered as tablets, gel packs, capsules, gelatin capsules, flavored drinks, as a powder that can be reconstituted into such a drink, cooking oil, salad oil or dressing, sauce, syrup, mayonnaise, margarine or the like. Furthermore, the food product, dietary supplements, and the like, of the present invention can include, but are not limited to, dairy products, baby food, baby formula, beverages, bars, a powder, a food topping, a drink, a cereal, an ice cream, a candy, a snack mix, a baked food product and a fried food product. Beverages of the invention include but are not limited to energy drinks, nutraceutical drinks, smoothies, sports drinks, orange juice and other fruit drinks. A bar of the present invention includes, but is not limited to, a meal replacement, a nutritional bar, a snack bar and an energy bar, an extruded bar, and the like. Dairy products of the invention include, but are not limited to, including but not limited to yogurt, yogurt drinks, cheese and milk. Compositions intended for oral administration may be prepared according to any known method for the manufacture of dietary supplements or pharmaceutical preparations, and such compositions may include at least one additive selected from the group consisting of taste improving substances, such as sweetening agents or flavoring agents, stabilizers, emulsifiers, coloring agents and preserving agents in order to provide a dietetically or pharmaceutically palatable preparation. Vitamins, minerals and trace element from any physiologically acceptable source may also be included in the composition of the invention.

25 In some embodiments, a pharmaceutical composition of the invention comprises the compositions of the invention in a therapeutically effective amount. The compositions of the invention can be formulated for administration in accordance with known pharmacy techniques. See, e.g., Remington, The Science And Practice of Pharmacy (9th Ed. 1995). In the manufacture of a pharmaceutical composition according to the invention, the lipid compositions (including the physiologically acceptable salts thereof) is typically admixed with, inter alia, an acceptable carrier. The carrier will be compatible with any other ingredients in the formulation and must not be deleterious to the subject.

Biofuel

Many of the existing technologies for making biofuel from algae are expensive, inefficient and unsustainable when operated at a scale that is required to displace any meaningful fraction of petrodiesel in the market. The supply and expenditure of energy to harvest and process algae are often underestimated. To produce biodiesel from algae
5 conventionally, the algae are typically harvested from a culture at a concentration of about 0.2 g/L in water. The harvested algae are then dewatered which increases the algal concentration to form an algal paste of about 15% solids. The paste is then fully dried by evaporating the water. Oil is then extracted from the dried algae with an organic solvent, such as hexane, which is removed by distillation from the algal oil. This conventional
10 method for generating biodiesel from algae is prohibitively expensive.

For example, when algae grows in a natural body of water, the algal biomass is relatively dilute considering the volume of water. Producing a gallon of oil requires processing of about 20,000 to 40,000 gallons of water. The energy cost of transporting and processing such a large volume of water is high. As example, 2,500 gallons of oil/acre/year
15 could be produced if algae with 25% of its mass as lipids could be produced at 25 g/m²/day. For this example, 50 million gallons of water must be processed to produce the 2,500 gallons of oil. The standard approach of pumping water to a centralized facility for dewatering is simply too energy-intensive and cost prohibitive. As example, a relatively small algal oil facility that produced 20 million gal/year would expend more energy pumping
20 water from the pond to a central facility than that contained in the oil product, resulting in a net negative energy balance.

Accordingly, in some embodiments, the invention provides a method for preparing an algal biomass and/or lipid/fatty acid extract (e.g., a lipid/fatty acid composition) from an algal biomass, grown under conditions to contain elevated levels of total fat, the method
25 comprising obtaining lipids from an algal biomass cultured under a culture condition sufficient to provide an algal biomass with elevated total fat content (e.g., total fat content greater than 67% of the biomass), wherein the algal biomass is harvested at a negative growth acceleration phase or a stationary phase of the algae. In another embodiment, the algal biomass is harvested during a logarithmic growth phase of the algae. Methods for obtaining a
30 lipid composition from an algal biomass of the invention are described herein.

Accordingly, in some embodiments, the invention provides a biofuel feedstock or a biofuel comprising lipids, hydrocarbons, or both, derived from an algal culture and/or algal biomass generated according to the methods of the invention. In some embodiments, lipids or algal compositions comprising the same are subdivided according to polarity: neutral lipids

and polar lipids. The major neutral lipids are triglycerides and free saturated and unsaturated fatty acids. The major polar lipids are acyl lipids, such as glycolipids and phospholipids. In some embodiments, a composition comprising lipids and hydrocarbons of the invention is described and distinguished by the types and relative amounts of fatty acids and/or

5 hydrocarbons present in the composition. In some embodiments, the hydrocarbons present in algae compositions of the invention are mostly straight chain alkanes and alkenes, and may include paraffins and the like having up to 36 carbon atoms.

In some embodiments, the invention provides a method of making a liquid fuel that comprise processing lipids derived from an algal culture and/or algal biomass or lipid fraction
10 thereof described herein. Products of the invention made by the processing algal derived biofuel feedstocks can be incorporated or used in a variety of liquid fuels including but not limited to, diesel, biodiesel, kerosene, jet-fuel, gasoline, JP-1, JP-4, JP-5, JP-6, JP-7, JP-8, Jet Propellant Thermally Stable (JPTS), Fischer-Tropsch liquids, alcohol-based fuels including ethanol-containing transportation fuels, other biomass-based liquid fuels including cellulosic
15 biomass-based transportation fuels.

In some embodiments, triacylglycerides in algal oil is converted to fatty acid methyl esters (FAME or biodiesel), for example, by using a base-catalyzed transesterification process (for an overview see, e.g., K. Shaine Tyson, Joseph Bozell, Robert Wallace, Eugene Petersen, and Luc Moens, "Biomass Oil Analysis: Research Needs and Recommendations,
20 NREL/TP-510-34796, June 2004, hereby incorporated by reference in its entirety). In some embodiments, the triacylglycerides are reacted with methanol in the presence of NaOH at 60 C. for 2 hrs to generate a fatty acid methyl ester (biodiesel) and glycerol. In further embodiments, the biodiesel and glycerol co-products are immiscible and typically separated downstream through decanting or centrifugation, followed by washing and purification. Free
25 fatty acids (FFAs) are a natural hydrolysis product of triglyceride and formed by reacting triacylglycerides and water. In some embodiments, methods of the invention further comprise a step for quickly and substantially drying the algal oil by techniques known in the art to limit production of free fatty acids, preferably to less than 1%. In another embodiment of the invention, the methods can further comprise a step for converting or removing the free
30 fatty acids by techniques known in the art.

In some embodiments, triacylglycerides in algal oil is converted to fatty acid methyl esters (FAME or biodiesel) by acid-catalyzed transesterification, enzyme-catalyzed transesterification, or supercritical methanol transesterification. Supercritical methanol transesterification does not require a catalyst (See, e.g., Kusdiana, D. and Saka, S., "Effects of

water on biodiesel fuel production by supercritical methanol treatment," Bioresource Technology 91 (2004), 289-295; Kusdiana, D. and Saka, S., "Kinetics of transesterification in rapeseed oil to biodiesel fuel as treated in supercritical methanol," Fuel 80 (2001), 693-698; Saka, S., and Kusdiana, D., "Biodiesel fuel from rapeseed oil as prepared in supercritical methanol," Fuel 80 (2001), 225-231). The reaction in supercritical methanol reduces the reaction time from 2 hrs to 5 minutes. In addition, the absence of the base catalyst NaOH greatly simplifies the downstream purification, reduces raw material cost, and eliminates the problem with soaps from free fatty acids. Rather than being a problem, the free fatty acids become valuable feedstocks that are converted to biodiesel in the supercritical methanol as follows.

In some embodiments, triacylglycerides are reduced with hydrogen to produce paraffins, propane, carbon dioxide and water, a product generally known as green diesel. The paraffins can either be isomerized to produce diesel or blended directly with diesel. In some embodiments, there are advantages of hydrogenation over conventional base-catalyzed transesterification. For example, the hydrogenation process (also referred to as hydrocracking) is thermochemical and therefore much more robust to feed impurities as compared to biochemical processes (e.g., hydrocracking is relatively insensitive to free fatty acids and water). Free fatty acids are readily converted to paraffins, and water simply reduces the overall thermal efficiency of the process but does not significantly alter the chemistry. In another non-limiting example, the paraffin product is a pure hydrocarbon, and therefore indistinguishable from petroleum-based hydrocarbons. Unlike biodiesel which has a 15% lower energy content and can freeze in cold weather, green diesel has similar energy content and flow characteristics (e.g., viscosity) to petroleum-based diesel. In various embodiments, the methods of the invention encompass the steps of hydrocracking and isomerization, which are well known in the art to produce liquid fuels, such as jet-fuel, diesel, kerosene, gasoline, JP-1, JP-4, JP-5, JP-6, JP-7, JP-8, and JPTS.

EXPERIMENTAL

The following examples are provided in order to demonstrate and further illustrate certain preferred embodiments and aspects of the present invention and are not to be construed as limiting the scope thereof.

EXAMPLE 1

Growth of high fat algal biomass

Experiments were conducted during development of embodiments of the invention in order to characterize and establish methods for heterotrophic algae production, and in particular, methods of culturing algae in order to generate an algal biomass containing high fat/lipid levels. A series of conventional heterotrophic algae production studies was performed and run in batch.

A culture of *Schizochytrium limacinum* was obtained and stored in 1.5mL cryovials at -80 C. For each experiment, the process was started by thawing cryovials and aseptically adding to 1.0L shake flasks of with media. Media in the 1 L flasks contained 50 g/L sugar, 10 g/L yeast extract, and 4 g/L sea salt. Three liters of 3 to 6 day old shake flask culture was used to inoculate a 250 L vessel containing media, grown for 24-48 hours, and then transferred to a main vessel (17,000 to 28,000L) and run as a batch process for 36 to 72 hours. The temperature of the batch runs was kept between 25 and 30 C. The temperature range was large due to lack of precise control of the system. The media used in the seed (250L) and batch (17,000 to 28,000L) runs was as follows:

Raw material	Batched	
Sugar	50	g/L
Yeast Extract	7.5	g/L
MgSO ₄	0.1538	g/L
Urea	2	g/L
CaCl ₂	0.1538	g/L
MgCl ₂	0.1538	g/L
Antifoam	0.3	ml

Table 1A. Media used in traditional batch and seed cultures.

Total fat content of the algal biomass of the batch cultures was determined by gas chromatography (See AOAC gravimetric method 922.06), acid hydrolysis (See Total Fat by Acid Hydrolysis Ankom Technology Method 1, 02-10-09), and High Temperature Solvent Extraction (See Ankom Technology Method 2, 01-30-09 and AOCS Method 5-04). In brief, a typical analysis procedure for fermentation broth was as follows: Broth samples were concentrated by centrifugation. After decanting, the sample was freeze dried for 24 hours with resultant moisture less than one percent. The samples were weighed prior to acid hydrolysis, washed and dried in an oven. This was followed by an extraction process under

gradient thermal conditions with petroleum ether. The hydrolysis and extraction process were undertaken utilizing automated instruments. After further drying, results were determined on the basis of mass loss.

As shown in Table 1B below, the total fat/lipid levels (w/w) achieved in the batch productions at a temperature range from 25-30 C was 8-38%.

Log run #	Total fat (%)
A-1-10	33.75
A-2-10	38.59
A-3-10	27.30
A-4-10	38.51
A-5-10	7.82
A-7-10	33.33
A-8-10	34.85
A-9-10	27.21

Table 1B. Total fat content of algal biomass grown in batch run between 25-30 C.

Efforts were made to increase the amounts of fat/lipid levels as these amounts were considered too low to be of value and additional experiments were run in an effort to increase the level of lipids produced in cultured algae.

During development of embodiments of the invention, experiments were conducted in order to determine if changes in the constituents and/or amounts or ratios of the same in the media could provide different algal growth characteristics. In addition, experiments were conducted to determine if scale-up of an algal culture system would alter algal growth characteristics. In particular, the amounts and ratios of MgSO_4 , Urea, CaCl_2 , MgCl_2 , and KH_2PO_4 were modified in an attempt to increase the level of lipid produced by cultured algae.

Results of fermentations produced in a batch volume of 10L are shown below:

lab trial runs - 10L						
Ingredients/log #	NB4-030311	NB6-030311	NB4-032311	NB6-032311	NB3-032811	NB4-032811
(g/L)						
Sugar	50	50	50	50	50	50
Yeast Extract	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
MgSO_4	0.1538	0.1538	0.1538	0.1538	0.5	1
NaCl	0	0	0	0	0	0

Urea	2	2	2	2	1	1
ZnSO ₄	0.1538	0.1538	0.1538	0.1538	0.1538	0.1538
CaCl ₂	0.1538	0.1538	0.1538	0.1538	1	2
MgCl ₂	0.1538	0.1538	0.1538	0.1538	0.5	1
KH ₂ PO ₄	-	-	1.5	1.5	0.5	1
Trace (liquid) – ml	10	10	10	10	20	20
Ferric Chloride						
Zn sulfate						
Mn sulfate						
Boric acid						
Copper sulfate						
Feed						
Urea:KH ₂ PO ₄	urea 200g/L	urea 200g/L	2:1	2:1.5	2:0.5	2:0.5
temp set point	30	30	30	30	30	30
fat %	8.13	6.89	88.98	84.28	56.1	64.3
Notes	strong NH ₃ smell	strong NH ₃ smell				
	ph issues	ph issues				
	foam out	foam out				

Table 2: 10L fermentation conditions and results.

Ingredients/log #	NB6-032811	NB3-040711	NB4-040711	NB6-040711	NB3-041911	NB4041911	NB6041911
(g/L)							
Sugar	50	50	50	50	50	50	50
Yeast Extract	7.5	7.5	7.5	5	7.5	7.5	6.25
MgSO ₄	2	2	2	2	2	2	2
NaCl	0	0	0	0	0	0	0
Urea	1	1	1	1	1	1	1
ZnSO ₄	0.1538	0.1538	0.1538	0.1538	0	0	0
CaCl ₂	4	4	4	4	4	4	4
MgCl ₂	2	2	2	2	2	2	2
KH ₂ PO ₄	2	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Trace (liquid) - ml	20	20	20	20	20	20	20
Ferric Chloride							
Zn sulfate							
Mn sulfate							
Boric acid							
Copper sulfate							
Feed							
Urea:KH ₂ PO ₄	2:0.5	2:0.5	2:0.5	2:0.5			

temp set point	30	30	30	30	30	30	30
fat %	73.7	71.16	73.49	73.88	68.69	76.56	72.56

Table 3: Additional 10L fermentation conditions and results.

Ingredients/log #	NB3061411	NB4061411	NB6061411	NB306211	NB406211	NB603211	NB3062811	NB4062811	NB6032811
(g/L)									
Sugar	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Yeast Extract	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
MgSO4	0.1538	2	2	2	2	2	0.1538	2	2
NaCl	0	0	0	4	8	0	0	0	0
Urea	2	1	1	1	1	1	1	1	1
ZnSO4	0.1538	0.1538	0	0	0	0	0	0	0
CaCl2	0.1538	4	4	4	4	4	4	0.1538	4
MgCl2	0.1538	2	2	2	2	2	2	2	0.1538
KH2PO4	2	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Trace (liquid) - ml	10	10	0	0	0	0	0	0	0
Ferric Chloride									
Zn sulfate									
Mn sulfate									
Boric acid									
Copper sulfate									
Feed									
Urea:KH2PO4	2:0.5	2:0.5	2:0.5	2:0.5	2:0.5	2:0.5	2:0.5	2:0.5	2:0.5
temp set point	30	30							
fat %	46.52	65.04	67.61	61.28	62.95	68.53	49.25	54.41	64.97
	Fomular confirmation			NaCl effects			Salt ratio effects		

Table 4: Additional 10L fermentation conditions and results.

- 5 These experiments, conducted during development of embodiments of the invention, indicated that certain amounts/ratios of substrates present within the media had a direct impact on algal growth characteristics (e.g., total biomass achieved as well as amount of fat and/or other component content within the biomass itself). Parameters that provided a high fat content biomass in the 10L runs were then utilized to determine if they would be
- 10 successful for large scale production of a high fat content biomass.

EXAMPLE 2

Large scale production of high fat algal biomass

- The initial attempts to generate a heterotrophic algal biomass described in Example 1
- 15 above utilized procedures based on yeast fermentation processes. The processes were run in

batch due to limitations in the production facility (Nicholasville, KY) and temperatures that could only be controlled between 25 and 30 C. The temperature range was large due to lack of precise control of the system. As indicated in Table 1, above, the fat levels achieved at the Nicholasville, KY plant ranged from 8-38%. However, as indicated above, additional
 5 experiments were carried out during development of embodiments of the invention that provided the identification of certain ratios/amounts of substrates that could be utilized during heterotrophic algal biomass production to alter algal growth and biomass generation/properties. Modification of the levels and ratios of the media (e.g., MgSO₄, Urea, CaCl₂, MgCl₂, and KH₂PO₄) during fermentation was identified and characterized to alter
 10 algal growth, and to generate a biomass with significantly different properties (e.g., a significantly higher fat content biomass). As described below, the process (including media containing the identified ratios/amounts of substrates effective in generating a high fat content algal biomass (e.g., greater than 67% fat content)) was further tested and run in large scale and also as a fed-batch (thereby allowing for modification and control of amounts of
 15 nitrogen, phosphorus, potassium, and carbon during the run).

A culture of *Schizochytrium limacinum* was obtained and stored in 1.5mL cryovials at -80 C. For each culture, a cryovial was thawed and aseptically added to 1.0L shake flask of media. Media in the 1 L flasks contained the components as shown in Table 5:

Ingredient	Batched	Manufacturer
Sugar	50 g/L	Cargill – Hammond, IN, USA
Yeast Extract	10 g/L	Sensient – Indianapolis, IN, USA
Sea Salt	4 g/L	Sigma-Aldrich – St. Louis, MO USA

20 Table 5. Media used for 1.0L culture.

The temperature of the shake flasks containing *Schizochytrium limacinum* in media was kept at 30 C and shaken at 250 RPM until such time that the algae had entered logarithmic/exponential growth phase but prior to depletion of glucose in the media (usually
 25 72-144 hours).

The contents of 1L culture flasks were then aseptically transferred into 2.0L aspirator bottles with sterile connectors that were used to connect to larger vessels (40L or 27 L or 18 L vessels). Thus, the 1L culture flask cultures were used as inoculum and aseptically added to a seed vessel (either 40L or 27L or 18L) containing media described in Table 6 below:

Ingredient	g/L	Manufacturer
Sugar	50	Cargill – Hammond, IN, USA
Yeast Extract	7.5	Sensient – Indianapolis, IN, USA
MgSO ₄	0.1538	Norkem Limited – Kutahya, Turkey
CaCl ₂	0.1538	Occidental Chemical Company – Dallas, TX
MgCl ₂	0.1538	North American Salt Company – Overland Park, KS

Table 6. Media used for 18L or 27L, first seed cultures.

The first seed stage (40/18/27L) was run at 30 C, under airflow and agitation conditions so as to maintain dissolved oxygen at or above 10%, and until at least 20 g/L of glucose was consumed. When grown under sterile conditions, no pH control was required. Rather, the pH stayed within a healthy range throughout the fermentation process. The first seed stage (40/18/27L) was considered completed when algal growth was within log/exponential growth stage, glucose had not been depleted from the media, but at least 20 g/L of glucose had been consumed (in general, this occurred between about 24-48 hours). A larger vessel (4000/2000L) was made ready for the first seed stage culture (e.g., it was filled with media and brought to 30 C under sterile conditions).

Upon completion of the first seed culture, the contents of the first seed stage (40/18/27L) culture vessel was transferred to a vessel with at least 2,000L media described in Table 7 below:

Ingredient	g/L	Manufacturer
Sugar	50	Cargill – Hammond, IN, USA
Yeast Extract	7.5	Sensient – Indianapolis, IN, USA
MgSO ₄	0.1538	Norkem Limited – Kutahya, Turkey
CaCl ₂	0.1538	Occidental Chemical Company – Dallas, TX
MgCl ₂	0.1538	North American Salt Company – Overland Park, KS

Table 7. Media used for 4,000/2000L, second seed cultures.

This second seed stage (4000/2000L) culture was run at 30 C, under airflow and agitation conditions so as to maintain dissolved oxygen at or above 10%, and until at least 20 g/L of glucose was consumed. When grown under sterile conditions, no pH control was required. Rather, the pH stayed within a healthy range throughout the fermentation process.

- 5 The second seed stage (4000/2000L) was considered completed when algal growth was within log/exponential growth stage, glucose had not been depleted from the media, but at least 20 g/L of glucose had been consumed (in general, this occurred between about 24-48 hours).

10 Upon completion of the second seed (4000/2000L) culture, the contents of the second seed culture were aseptically transferred into a third culture vessel with a volume ranging between 70,000 L to 220,000 L of sterile media at 30 C as described in Table 8 below:

Batch		
Raw material	Batched	Manufacturer
Sugar	50 g/L	Cargill -- Hammond, IN, USA
Yeast Extract	7.5 g/L	Sensient -- Indianapolis, IN, USA
MgSO ₄	4 g/L	Norkem Limited -- Kutahya, Turkey
Urea	1 g/L	PCS Sales -- Northbrook, IL
CaCl ₂	2 g/L	Occidental Chemical Company -- Dallas, TX
MgCl ₂	2 g/L	North American Salt Company -- Overland Park, KS
KH ₂ PO ₄	0.25 g/L	Lidochem -- Hazlet, NJ

15 When 30 g/L of glucose had been consumed by algae present in the third culture vessel (70,000-220,000 L vessel), glucose and fed-batch feeds were started. Glucose was maintained at 10 g/L during large scale culture of algae in the third culture vessel (70,000-220,000 L vessel). As described in Table 9 below, the feed used for the fed-batch process contained:

Feed		
Ingredient	g/L	Manufacturer
Urea	2 g/L	PCS Sales -- Northbrook, IL
KH ₂ PO ₄	0.5 g/L	Lidochem -- Hazlet, NJ

Table 9. Feed used for fed-batch process.

The fed batch feed was added over a 34 hour period. Although an understanding of the mechanism is not needed to practice the present invention, and while the present invention is not limited to any particular mechanism of action, in some embodiments, this time period was identified based upon the observation that it took ~ 20 hours for the feed to start (for 30 g/L of glucose to be consumed by the algae present in the third culture vessel). The feed was then stopped (e.g., at around log hour 54) in order to allow all of the nutrients to be removed (consumed) from the media. Harvest of the algal biomass took place upon the termination of exponential growth, occurring generally between the log hours 66-76.

The culture broth was de-sludge centrifuged under conditions to achieve 15-30% solids, with the concentrate spray dried to remove water to a final moisture of less than 5%.

Results of several independent, large scale cultures are shown in Figure 1 and Tables 10-12 below:

Run number	Fat % (harvest sample)	Vol adjusted Biomass (g/L)	% recovery from centrifuge	Fat % (spray dried product)	Protein % (spray dried Product)	Moisture % spray dried product
F1-2-11	60.7*	86.2		75.7	11.66	1.47
F1-3-11	69.64	86.4	55	70.25	16.47	1.37
F1-4-11	74.76	66.5	67	71.56	15.92	2.11
F1-5-11	73.12	70.8	68	65.65	17.14	2.43
F1-6-11	62.77**	45.7	89	54.8	13.35	2.14
F2-1-11	72.59	50.9	87	65.89	17.64	2.72
F2-2-11	70.81	59.5	52	66.49	15.29	2.15

Table 10. Large scale production culture results.

*bad harvest sample

** process control problems with this batch

○ F1-2-11

- Had a batch volume of 70,000 L and a harvest volume of 93,700 L

○ F1-3-11

- Had a batch volume of 70,000 L and a harvest volume of 84,000 L

○ F1-4-11

- Had a batch volume of 70,000 L and a harvest volume of 92,300 L

○ F1-5-11

- Had a batch volume of 70,000 L and a harvest volume of 82,300 L

○ F1-6-11

- Had a batch volume of 80,000 L and a harvest volume of 83,600 L

○ F2-1-11

- Had a batch volume of 110,000 L and a harvest volume of 113,000L
- F2-2-11
 - Had a batch volume of 110,000 L and a harvest volume of 125,600L

The biomass generated from each large scale, fed-batch culture was characterized, including analysis of the total fat (saturated and unsaturated fat) content; moisture, docosahexaenoic acid (DHA) content, palmitic acid content, crude protein content and ash content (See, e.g., Fat content and/Moisture – AOCS Am 5-04 ‘Rapid Determination of Oil/Fat Utilizing High Temperature Solvent Extraction’ v. 3/31/10; DHA/Palmitic – AOCS Method Ce 1b-89 and AOAC Method of Analysis 991.39; Protein – AOAC 990.03; Ash – AOAC 942.05 Vol adjusted Biomass (g/L) – Stone, et. al. Dry Weight Measurement of Microbial Biomass and Measurement Variability Analysis. Biotechnology Techniques. Vol 6: 207- 212.

Table 11						
Run #/Comments	TOTAL FAT % (Final Harvest)	Moisture (%) Max 6%	DHA (mg/g)	Palmitic (mg/g)	Crude Protein (%) Report on release	Ash max 10%
SL-F1-1-11	72.70	1.39	191.8	379	14.96	3.5
SL-F1-3-11	69.64	1.37	181.1	366.2	16.47	3.08
SL-F1-4-11	73.71	2.11	185.8	373.8	15.92	3.11
SL-F1-5-11	73.12	2.43	176.8	351.3	17.14	0.0373
SL-F2-1-11	72.59	2.72	252.4	360.9	17.64	0.0363
SL-F2-2-11	70.81	2.15	247.2	365	15.29	0.041
SL-F2-3-11	72.86	2.50	197.36	269.4	11.58	3.29
SL-F2-4-11	69.03	3.07	177.9	133.65	18.23	3.9
SL-F2-5-11	70.10	2.12%	203.24	193.99	10.93	0.0342
SL-F2-6-11	73.55	2.61	203.99	206.67	12.01	3.34
SL-F2-8-11	70.86	1.91	190.31	287.79	12.71	3.3
SL-F2-9-11	76.89	1.68	191.69	227.52	9.62	3
SL-F1-8-11	76.31	1.55	191.41	318	10.71	3.8
SL-F2-10-11	72.15	1.75	186.24	256.13	13.37	4.81
SL-F2-11-11	73.64	2.49	184.34	299.77	11.45	4.42
SL-F1-9-11	75.57	1.28	202.51	250.01	10.02	3.48
SL-F2-13-11	70.95	1.66	182.82	326.94	12.39	4.59
SL-F2-14-11	69.13	1.42	196	253.11	14.79	3.65

SL-F1-13-11	67.56	1.73	184.66	212.92	15.1	3.97
SL-F1-14-11	68.57	1.23	170.16	89.35	11.86	4.22
SL-F3-4-11	68.8	1.56	203.25	183.65	15.31	3.84
SL-F1-15-11	70.58%	1.14	175.58	147.37	9.8	3.56
SL-F1-16-11	72.72	1.31	175.28	91.4	10.43	4.06
SL-F3-8-11	71.75	1.8	207.95	138.37	14.32	3.65
SL-F5-5-11	68.7	1.23	189.07	119.72	11.68	3.42
SL-F1-25-11	74.80	1.54			9.16	3.68
SL-F3-14-11	76.24	1.90			8.41	3.08
SL-F3-15-11	75.80	1.08			7.3	3.26
SL-F1-1-12	70.24				8.3	3.51

Table 11. Characterization of large scale cultures

Table 12						
Run #/Comments	TOTAL FAT % (Final Harvest)	Moisture (%) Max 6%	DHA (mg/g)	Palmitic (mg/g)	Crude Protein (%) Report on release	Ash max 10%
SL-F1-25-11	74.80	1.54	170.63	355.6	9.16	3.68
SL-F3-14-11	76.24	1.90	179.85	346.41	8.41	3.08
SL-F3-15-11	75.80	1.08	182.81	367.01	7.3	3.26
SL-F1-1-12	70.24	1.81	160.84	336.77	8.3	Released
SL-F4-1-12	68.53	1.71	189.06	332.29	10.26	3.56
SL-F6-2-12	69.13	1.73	169.44	351.39	7.75	3.11
SL-F5-2-12	75.00	1.84	175.05	371.57	6.89	3.5
SL-F4-2-12	69.10	1.84	198.24	341.94	8.85	3.88
SL-F6-3-12	69.34	1.80	175.42	340.86	10.44	3.62
SL-F5-3-12	67.28	3.61	176.61	360.01	10.19	3.56
SL-F1-2-12	71.09	1.72	154.22	371.31	12.56	3.78
SL-F1-4-12	68.42	1.66	159.54	375.98	12.88	3.81
SL-F4-5-12	70.89	1.88	171.73	397.13	12.38	3.1
SL-F6-6-12	70.38	1.8	155.05	377.11	12.56	3.71
SL-F5-6-12	68.17	1.75	155.73	389.31	10.56	3.8
SL-F3-3-12	73.64	1.94%	156.25	393.08	12.13	3.52
SL-F1-7-12	71.97	1.58	164.05	362.4	8.75	3.98
SL-F3-4-12	70.93	2.37	183.88	366.83	10.13	2.23
SL-F6-7-12	70.95	2.66	176.68	366.29	10.56	4.31
SL-F1-8-12	72.08	1.94	172.91	407.2	9	3.62
SL-F3-6-12	72.15	1.85			10.56	7.56
SL-F3-7-12	69.63	2.42			10.57	3.67
SL-F3-8-12	71.77	1.78				
SL-F3-9-12	69.18	1.74				

Table 12. Characterization of large scale cultures

Additionally, the fatty acid profile of the biomass was characterized. As shown in Figure 2, the fatty acid profile of each algal biomass generated is highly similar/consistent, independent of the total fat content of the biomass. A composite fatty acid profile, taking into consideration the collective profiles of all samples analyzed, is provided in Figure 3.

The glyceride profile was also determined for each algal biomass. Of the total glyceride content of the biomass, about 4-8% were diglycerides, less than 1% glycerol, about 3-7% monoglycerides and about 84-88% triglycerides.

EXAMPLE 3

Biomass harvesting

Experiments conducted during development of embodiments of the invention identified that the increased total fat levels in the biomass caused significant problems with regard to centrifugation of the algal biomass. Recovery of biomass content post-centrifugation ranged from only about 45-85% total biomass weight. This is shown, for example, in Table 13 below:

Run number	Fat % (harvest sample)	Vol adjusted Biomass (g/L)	Protein % (harvest sample)	% recovery from centrifuge	Fat % (spray dried product)	Protein % (spray dried Product)	Moisture % spray dried product
F1-2-11	60.7*	86.2	NA	NA	75.7	11.66	1.47
F1-3-11	69.64	86.4	NA	55	70.25	16.47	1.37
F1-4-11	74.76	66.5	NA	67	71.56	15.92	2.11
F1-5-11	73.12	70.8	16.14	68	65.65	17.14	2.43
F1-6-11	62.77**	45.7	NA	89	54.8	13.35	2.14
F2-1-11	72.59	50.9	16.29	87	65.89	17.64	2.72
F2-2-11	70.81	59.5	12.58	52	66.49	15.29	2.15

Table 13. Comparison of Fat and Protein yield from direct harvest sample versus spray dried product.

*bad harvest sample** process control problems with this batch
F1-2-11

- Had a batch volume of 70,000 L and a harvest volume of 93,700 L

F1-3-11

- Had a batch volume of 70,000 L and a harvest volume of 84,000 L

F1-4-11

- Had a batch volume of 70,000 L and a harvest volume of 92,300 L

F1-5-11

- Had a batch volume of 70,000 L and a harvest volume of 82,300 L
- F1-6-11
- Had a batch volume of 80,000 L and a harvest volume of 83,600 L
- F2-1-11
- Had a batch volume of 110,000 L and a harvest volume of 113,000L
- F2-2-11
- Had a batch volume of 110,000 L and a harvest volume of 125,600L

The recovery problems were identified to be attributable to the increase in the amount of low density lipid/oil in the biomass. Thus, experiments were conducted during
 15 embodiments of the invention in an effort to address this problem.

One approach that displayed the ability to enhance recovery of the biomass was to chill the culture comprising the algal biomass prior to centrifugation. Although an understanding of a mechanism is not needed to practice the invention, and the invention is not limited to any particular mechanism of action, in some embodiments, chilling the culture
 20 increased the density of the lipid/oil and allowed a larger recovery of the biomass.

Experiments were conducted in order to determine the effects of chilling the biomass before centrifugation.

Lab trial one: 2 gallons of broth collected and stored at 7-8 C for 16 plus hours. Eight X 50 ml centrifuge tubes were collected and placed in a water bath to reach target
 25 temperatures described in table 14 below. All samples were centrifuged at 5000 rpm for 5 minutes.

Temperature (C)	Visual Observation
10	Excellent separation with no floating cells. Clear supernatant.
20	Good separation with no floating cells. Cloudier than 10C
25	Similar to 20 C; cloudier
30	Good separation with no floating cells; cloudier
35	Good separation with no floating cells; very cloudy

40	Still separating; floating cells; milky supernatant
45	Poor separation
50	Almost no separation with numerous floating cells

Table 14. Culture temperature and centrifugation results of trail 1.

Lab trial 2: Fresh broth samples were collected and tested over a temperature range of 10-30C. They were not refrigerated overnight as in trial 1. All samples were allowed to sit in an ice water bath to target temperature. Samples were centrifuged at 5000 rpm for 5 minutes.

Temperature (C)	Visual Observation	Density (g/ml)
10	Excellent separation with no floating cells. Clear supernatant.	1.01967
15	Good separation with no floating cells. Very cloudy supernatant	
20	Sample still separating; visible flocculation.	
25	Very similar to 20C; increasing cloudiness	
30	Still Good separation; increasing cloudiness	1.02915

Table 13. Culture temperature and centrifugation results of trail 2.

As described in Example 2 and Figure 1, during large scale production, chilling of the biomass prior to recovery (centrifugation) lead to significant increase in total recovery of the biomass. Multiple large scale runs have been completed with total recovery of approximately 95%.

All publications and patents mentioned in the above specification are herein incorporated by reference. Various modifications and variations of the described compositions and methods of the invention will be apparent to those skilled in the art without

departing from the scope and spirit of the invention. Although the invention has been described in connection with specific preferred embodiments, it should be understood that the invention as claimed should not be unduly limited to such specific embodiments. Indeed, various modifications of the described modes for carrying out the invention that are obvious
5 to those skilled in the relevant fields are intended to be within the scope of the present invention.

CLAIMS

What Is Claimed Is:

- 5 1. A process of making an algal biomass comprising at least 67% total fat comprising culturing an algae under culture conditions sufficient to provide an algal biomass comprising 67% or more total fat.
2. The process of claim 1, wherein the algae biomass is cultured in two or more types of
10 culture medium in a sequential manner.
3. The process of claim 2, wherein one culture medium of the two or more culture medium contains 50 g/L of a carbon source, about 7.5 g/L yeast extract, about 0.15 g/L magnesium sulfate, about 0.15 g/L calcium chloride and 0.15 g/L magnesium chloride.
15
4. The process of claim 3, wherein the carbon source is a sugar.
5. The process of claim 4, wherein the sugar is glucose.
- 20 6. The process of claim 2, wherein one culture medium of the two or more culture medium contains 50 g/L of a carbon source, about 7.5 g/L yeast extract, about 4.0 g/L magnesium sulfate, about 1 g/L urea, about 2 g/L calcium chloride, about 2 g/L magnesium chloride and about 0.25 g/L monopotassium phosphate.
- 25 7. The process of claim 6, wherein the carbon source is a sugar.
8. The process of claim 7, wherein the sugar is glucose.
9. The process of claim 2, wherein one culture medium of the two or more culture
30 medium contains a carbon source, yeast extract and sea salt.
10. The process of claim 9, wherein the carbon source is a sugar.

11. The process of claim 10, wherein the sugar is glucose.
12. The process of claim 2, wherein the algae are cultured in a first culture medium containing glucose, yeast extract and sea salt; transferred into and incubated in a second
5 culture medium containing glucose, yeast extract, magnesium sulfate, calcium chloride and magnesium chloride; and transferred into and incubated in a third culture medium containing glucose, yeast extract, magnesium sulfate, urea, calcium chloride, magnesium chloride and monopotassium phosphate.
- 10 13. The process of claim 12, wherein the third culture medium is supplemented with a fed-batch feed.
14. The process of claim 13, wherein the fed-batch feed comprises urea and monopotassium phosphate.
- 15 15. The process of claim 12, wherein the algal biomass is harvested from the third culture medium between 12-24 hours after cessation of the fed-batch process.
16. The process of claim 15, wherein the algal biomass is harvested from the third culture
20 medium after all of the nutrients have been removed/consumed from the medium.
17. The process of claim 15, wherein the algal biomass is harvested via centrifugation of the third culture medium comprising the algal biomass.
- 25 18. The process of claim 17, wherein the third culture medium is chilled prior to harvesting the algal biomass.
19. The process of claim 18, wherein the third culture medium is chilled to between about 5 and 25 C.
- 30 20. The process of claim 1, wherein the algae is *Schizochytrium limacinum*.
21. The process of claim 12, wherein the first culture medium contains about 50 g/L glucose, about 10 g/L yeast extract and about 4 g/L sea salt.

22. The process of claim 12, wherein the second culture medium contains about 50 g/L glucose, about 7.5 g/L yeast extract, about 0.15 g/L magnesium sulfate, about 0.15 g/L calcium chloride and 0.15 g/L magnesium chloride.
- 5 23. The process of claim 12, wherein the third culture medium contains about 50 g/L glucose, about 7.5 g/L yeast extract, about 4.0 g/L magnesium sulfate, about 1 g/L urea, about 2 g/L calcium chloride, about 2 g/L magnesium chloride and about 0.25 g/L monopotassium phosphate.
- 10 24. The process of claim 1, wherein the culture conditions comprise running the algae culture at 30 C under airflow and agitation conditions so as to maintain dissolved oxygen at 10%.
- 15 25. The process of claim 1, wherein algae are cultured under sterile conditions.
26. An algal biomass having a total fat content of at least 67% by weight comprising about 170-250 mg/g docosahexaenoic acid (DHA) and about 150-400 mg/g palmitic acid.
- 20 27. A lipid composition prepared from the algal biomass of claim 26.
28. A food product comprising the lipid composition of claim 27.
29. A food product comprising the algal biomass of claim 26.
- 25 30. An algal biomass having a total fat content of at least 67% by weight.
31. Use of an algal biomass having a total fat content of at least 67% by weight in the preparation of a biofuel.
- 30 32. The use of claim 31, wherein the biofuel is biodiesel.

FIGURE 1

F2-2-11

# 2011	DATE POSTED	PROD ORDER #	VESSEL/ RUN#	Origin	Batch Volume (L)	Final Tank Volume(L)	BIOMASS g/L	Volume Adjusted g/L	% FAT
8	20110609	313486	F2-2-11	Seed	120000	123,600	53.71	55.32	70.81

(SL-F2-2-11) was inoculated on 5-31-11 from (G1A at log hour 73). This run was batched to 110,000 liters with media based on 120,000 liters.

1100 liters Fed batch media was added over a 38 hour period between log hours 24-62. 53,372 lbs of glucose was added during this run. The harvest was started on 06-03-11 at log hour 73. This run was clean and spray dried.

F2-3-11

# 2011	DATE POSTED	PROD ORDER #	VESSEL/ RUN#	Origin	Batch Volume (L)	Final Tank Volume(L)	BIOMASS g/L	Volume Adjusted g/L	% FAT
10	20110705	314418	F2-3-11	Seed	120,000	125,300	57.40	59.94	72.86

(SL-F2-3-11) was inoculated on 6-23-11 from (G1A at log hour 72). This run was batched to 110,000 liters with media based on 120,000 liters.

1100 liters Fed batch media was added over a 34 hour period between log hours 24 and 58. 64,693 lbs of glucose was added during this run. The harvest was started on 06-27-11 at log hour 89. This run was clean and spray dried.

F2-4-11

# 2011	DATE POSTED	PROD ORDER #	VESSEL/ RUN#	Origin	Batch Volume (L)	Final Tank Volume(L)	BIOMASS g/L	Volume Adjusted g/L	% FAT
11	20110709	314682	F2-4-11	Seed	120,000	114,700	29.11	27.82	69.03

FIGURE 1 CONTINUED

(SL-F2-4-11) was inoculated on 7-01-11 from (G1A at log hour 52). **1100** liters of fed batch media was added over a 34 hour period between log hours 34-68. **32,047** lbs of glucose was added during this run. The harvest was started on 07-05-11 at log hour 86. This run was clean and spray dried.

F2-5-11

# 2011	DATE POSTED	PROD ORDER #	VESSEL/ RUN#	Origin	Batch Volume (L)	Final Tank Volume(L)	BIOMASS g/L	Volume Adjusted g/L	% FAT
13	20110718	314973	F2-5-11	Seed	120,000	131,200	64.15	70.14	70.1

(SL-F2-5-11) was inoculated on 07-08-11 from (G1A at log hour 52). This run was batched to 110,000 liters with media based on 120,000 liters. **1100** liters of Fed batch media was added over a 38 hour period between log hours 24-62. **74,365** lbs of glucose was added during this run. Began chilling the vessel to 48°F at log hour 77. The harvest was started on 07-12-11 at log hour 82. This run was clean and spray dried.

F2-6-11

# 2011	DATE POSTED	PROD ORDER #	VESSEL/ RUN#	Origin	Batch Volume (L)	Final Tank Volume(L)	BIOMASS g/L	Volume Adjusted g/L	% FAT
14	20110725	315181	F2-6-11	Seed	120,000	131000	57.19	62.43	73.55

(SL-F2-6-11) was inoculated on 07-15-11 from (G1 at log hour 84). This run was batched to 110,000 liters with media based on 120,000 liters. **1,100** liters of Fed batch media was added over a 37 hour period between log hours 25 and 62. **65,520** lbs of glucose was added during this run. Began chilling down to 48°F at log hour 67. The harvest was started on 07-18-11 at log hour 77. This run was clean and spray dried.

FIGURE 1 CONTINUED

F2-8-11									
# 2011	DATE POSTED	PROD ORDER #	VESSEL/ RUN#	Origin	Batch Volume (L)	Final Tank Volume(L)	BIOMASS g/L	Volume Adjusted g/L	% FAT
16	20110804	315665	F2-8-11	Seed	120,000	126,400	56.51	59.52	70.86

(SL-F2-8-11) was inoculated on 7-25-11 from (G1 at log hour 77). 1,000 liters of Fed batch media was added over a 30 hour period between log hours 24 -54 . 61,576 lbs of glucose was added during this run. Started chilling the vessel to 48° F on 07-28-11 at log hour 61 due to contamination. Harvest was started on 07-28-11 at log hour. This run was clean and spray dried.

F2-9-11									
	DATE POSTED	PROD ORDER #	VESSEL/ RUN#	Origin	Batch Volume (L)	Final Tank Volume(L)	BIOMASS g/L	Volume Adjusted g/L	% FAT
18	20110811	315869	F2-9-11	Seed	120,000	133,200	59.54	66.09	76.89

(SL-F2-9-11) was inoculated on 8-03-11 from (G1A at log hour 89). 1200 liters of Fed batch media was added over a 40 hour period between log hours 24 -64. 74,300 lbs of glucose was added during this run. Stated chilling the vessel to 48° F on 08-06-11 at log hour 69. Harvest started at log hour 79. This was a clean run and Spray dried.

F2-10-11									
# 2011	DATE POSTED	PROD ORDER #	VESSEL/ RUN#	Origin	Batch Volume (L)	Final Tank Volume(L)	BIOMASS g/L	Volume Adjusted g/L	% FAT
19	20110816	316416	F2-10-11	D/R	120,000	131,500	50.98	55.87	72.15

(SL-F2-10-11) was inoculated on 8-08-11 from (G1 at log hour 769). 1200 liters of Fed batch media was added over a 37 hour period between log hours 24 -56. 70,906 lbs of glucose was added during this run. Started chilling the vessel to 48° F on 08-11-11 at log hour 72. Harvest was started on 08-08-21-11 at log hour 79. This run was clean and spray dried.

FIGURE 1 CONTINUED

F1-8-11

# 2011	DATE POSTED	PROD ORDER #	VESSEL/ RUN#	Origin	Batch Volume (L)	Final Tank Volume(L)	BIOMASS g/L	Volume Adjusted g/L	% FAT
20	20110817	316266	F1-8-11	Seed	80,000	87,000	70.40	76.56	76.31

(SL-F1-8-11) was inoculated on 8-11-11 from (G1A at log hour 77). 800 liters of Fed batch media was added over a 34 hour period between log hours 24 -58. 50,544 lbs of glucose was added during this run. Started chilling the vessel to 48° F on 08-11-11 at log hour 72. Harvest was started on 08-14-11 at log hour 89. This run was clean and spray dried.

F2-11-11

# 2011	DATE POSTED	PROD ORDER #	VESSEL/ RUN#	Origin	Batch Volume (L)	Final Tank Volume(L)	BIOMASS g/L	Volume Adjusted g/L	% FAT
21	20110822	316379	F2-11-11	Seed	120,000	129,400	57.39	61.89	73.64

(SL-F2-11-11) was inoculated on 8-14-11 from (G1 at log hour 81). 1205.6 liters of Fed batch media was added over a 35 hour period between log hours 24- 59. 72,745 lbs of glucose was added during this run. Started chilling the vessel to 48° F on 08-17-11 at log hour 72. Harvest was started on 08-18-11 at log hour 82. This run was clean and spray dried.

F1-9-11

# 2011	DATE POSTED	PROD ORDER #	VESSEL/ RUN#	Origin	Batch Volume (L)	Final Tank Volume(L)	BIOMASS g/L	Volume Adjusted g/L	% FAT
22	20110823	316489	F1-9-11	Seed	80,000	86000	76.18	81.89	75.57

FIGURE 1 CONTINUED

(SL-F1-9-11) was inoculated on 8-18-11 from (G1A at log hour 69). 804 liters of Fed batch media was added over a 37 hour period between log hours 24- 61. 46,555 lbs of glucose was added during this run. Started chilling the vessel to 48° F on 08-21-11 at log hour 72. Harvest was started on 08-22-11 at log hour 84. This run was clean and spray dried.

F2-13-11

# 2011	DATE POSTED	PROD ORDER #	VESSEL/ RUN#	Origin	Batch Volume (L)	Final Tank Volume(L)	BIOMASS g/L	Volume Adjusted g/L	% FAT
25	20110908	316981	SL F2-13-11	Seed	120,000	124,100	55.64	57.54	70.95

(SL-F2-13-11) was inoculated on 09-03-11 (from G1 @ log hour 80). 1208.6 liters of fed batch media was fed over a 34 hour period. 59,864 lbs. of glucose was fed over the duration of this run. Started chilling to 48 F on 09-06-11 at log hour 70. Started the harvest at log hour 84.

F2-14-11

# 2011	DATE POSTED	PROD ORDER #	VESSEL/ RUN#	Origin	Batch Volume (L)	Final Tank Volume(L)	BIOMASS g/L	Volume Adjusted g/L	% FAT
28	20110920	317584	F2-14-11	Seed	120,000	122,100	60.62	61.68	69.13

(SL-F2-14-11) was inoculated on 09-12-11 (from G1A @ log hour 77). 1207 liters of fed batch media was fed over a 38 hour period. 67,698 lbs. of glucose was fed over the duration of this run. Started chilling to 48 F on 09-16-11 at log hour 76. Started the harvest at log hour 84.

- Temperature deviation due to chilled water compressor failure (Vessel temperature reached 91 F).
- Lost air and buttoned up the fermenter due to chilled water compressor failure.

F1-13-11

# 2011	DATE POSTED	PROD ORDER #	VESSEL/ RUN#	Origin	Batch Volume (L)	Final Tank Volume(L)	BIOMASS g/L	Volume Adjusted g/L	% FAT
29	20110922	317681	F1-13-11	Seed	80,000	81,300	60.89	61.88	67.56

FIGURE 1 CONTINUED

(SL-F1-13-11) was inoculated on 09-16-11 (from G1 @ log hour). 600 liters of fed batch media was fed over a 34 hour period. 27,732 lbs of glucose was fed over the duration of this run. Started chilling to 48 F on 09-19-11 at log hour 65. Started the harvest at log hour 74

- Problems with fed batch flow control valve -- Changed diaphragm briefly exposing vessel --- No contamination detected during this run.
- Log hour 9 vessel heated to 93 F. Chilled water valve was closed due to control valve leaking by.

F1-14-11

# 2011	DATE POSTED	PROD ORDER #	VESSEL/ RUN#	Origin	Batch Volume (L)	Final Tank Volume(L)	BIOMASS g/L	Volume Adjusted g/L	% FAT
31	20110928	317961	F1-14-11	Seed	80,000	91,000	86.88	98.83	68.57

(SL-F1-14-11) was inoculated on 09-23-11 (from G1 @ log hour 64). 800 liters of fed batch media was fed over a 34 hour period. 45,590 lbs of glucose was fed over the duration of this run. Started chilling to 48 F on 09-26-11 at log hour 70. Started the harvest at log hour 83.

F3-4-11

# 2011	DATE POSTED	PROD ORDER #	VESSEL/ RUN#	Origin	Batch Volume (L)	Final Tank Volume(L)	BIOMASS g/L	Volume Adjusted g/L	% FAT
32	20111003	318192	SL F3-4-11	Seed	120,000	125,000	62.15	64.74	68.8

(SL-F3-4-11) was inoculated on 09-27-11 (from G1A @ log hour 90). 1205 liters of fed batch media was fed over a 34 hour period. 52,076 lbs of glucose was fed over the duration of this run. Started chilling to 48 F on 09-30-11 at log hour 70. Started the harvest at log hour 84.

- Foamed out approximately 4,500 liters at log 18.

F1-15-11

# 2011	DATE POSTED	PROD ORDER #	VESSEL/ RUN#	Origin	Batch Volume (L)	Final Tank Volume(L)	BIOMASS g/L	Volume Adjusted g/L	% FAT
34	20111010	318457	SL F1-15-11	Seed	80,000	86,100	89.83	96.67	70.58

FIGURE 1 CONTINUED

(SL-F1-15-11) was inoculated on 10-05-11 (from G1 @ log hour 100). 800 liters of fed batch media was fed over a 34 hour period. 59,984 lbs. of glucose was fed over the duration of this run. Started chilling down on 10-0 -11 at log hour 70. Started the harvest at log hour 78.

- Modified media.
- Modified fed batch media.

F1-16-11

# 2011	DATE POSTED	PROD ORDER #	VESSEL/ RUN#	Origin	Batch Volume (L)	Final Tank Volume(L)	BIOMASS g/L	Volume Adjusted g/L	% FAT
36	20111017	318716	SL F1-16-11	Seed	80,000	85,400	74.26	79.27	72.72

(SL-F1-16-11) was inoculated on 10-10-11 (from G1 @ log hour 84.5). 800 liters of fed batch media was fed over a 34 hour period. 39,851 lbs of glucose was fed over the duration of this run. Started chilling down on 10-13-11 at log hour 70. Started the harvest at log hour 77.

- Modified media.
- Modified fed batch media.
- Normal fed batch media.

F3-8-11

# 2011	DATE POSTED	PROD ORDER #	VESSEL/ RUN#	Origin	Batch Volume (L)	Final Tank Volume(L)	BIOMASS g/L	Volume Adjusted g/L	% FAT
46	20111111	319550	SL F3-8-11	Seed	120,000	130,200	75.70	82.13	71.75

(SL-F3-8-11) was inoculated on 11-03-11 (from G1 @ log hour 94). 1200 liters of fed batch media was fed over a 34 hour period. 67,800 lbs of glucose was fed over the duration of this run. Started chilling to 48° F on 11-06-11 at log hour 75. Started the harvest at log hour 91.

FIGURE 1 CONTINUED

F5-5-11

#	2011	DATE POSTED	PROD ORDER #	VESSEL/ RUN#	Origin	Batch Volume (L)	Final Tank Volume(L)	BIOMASS g/L	Volume Adjusted g/L	% FAT
48		20111115	319771	SL F5-5-11	Seed	220,000	233,560	69.81	74.11	68.7

(SL-F5-5-11) was inoculated on 11-08-11 (from SV3 @ log hour 90). 2217 liters of fed batch media was fed over a 34 hour period. 45,836 liters of glucose was fed over the duration of this run. Started transferring 50% of F4 to F2 and chilling to 48° F on 11-11-11 at log hour 78. Started harvesting to centrifuges from F2 at log hour 88.

F3-14-11

#	2011	DATE POSTED	PROD ORDER #	VESSEL/ RUN#	Origin	Batch Volume (L)	Final Tank Volume(L)	BIOMASS g/L	Volume Adjusted g/L	% FAT
63		20111222	321061	SL F3-14-11	Seed	120,000	132,400	73.30	80.87	76.24

(SL-F3-14-11) was inoculated on 12-16-11 (from G1 @ log hour 106). 1202.7 liters of fed batch media was fed over a 34 hour period. 74,355 lbs of glucose was fed over the duration of this run. Started chilling to 48° F on 12-19-11 at log hour 72. Started the harvest at log hour 87.

- * ph adjust chlorides with citric acid before filtering.

F1-25-11

#	2011	DATE POSTED	PROD ORDER #	VESSEL/ RUN#	Origin	Batch Volume (L)	Final Tank Volume(L)	BIOMASS g/L	Volume Adjusted g/L	% FAT
64		20111223	321102	SL F1-25-11	Seed	80,000	83,000	82.59	85.69	74.8

(SL-F1-25-11) was inoculated on 12-18-11 (from G1A @ log hour 91). 797.7 liters of fed batch media was fed over a 34 hour period. 43,673 lbs of glucose was fed over the duration of this run. Started chilling to 48° F on 12-21-11 at log hour 68. Started the harvest at log hour 94.

- * ph adjusted chlorides before filtering.

FIGURE 1 CONTINUED

F3-15-11

#	DATE POSTED	PROD ORDER #	VESSEL/ RUN#	Origin	Batch Volume (L)	Final Tank Volume(L)	BIOMASS g/L	Volume Adjusted g/L	% FAT
66	20111228	321150	SL-F3-15-11	Seed	120,000	131,000	71.15	77.67	75.8

(SL-F3-15-11) was inoculated on 12-23-11 (from G1 @ log hour 82). 1192.1 liters of fed batch media was fed over a 34 hour period. 76,953 lbs of glucose was fed over the duration of this run. Started chilling to 48° F on 12-26-11 at log hour 71. Started the harvest at log hour 85.

- * ph adjust chlorides with citric acid before filtering.

F1-1-12

#	DATE POSTED	PROD ORDER #	VESSEL/ RUN#	Origin	Batch Volume (L)	Final Tank Volume(L)	BIOMASS g/L	Volume Adjusted g/L	% FAT
1	20120103	321175	SL F1-1-12	Seed	80,000	83,600	76.18	79.61	70.24

(SL-F1-1-12) was inoculated on 12-25-11 (from G1A @ log hour 69). 806.4 liters of fed batch media was fed over a 34 hour period. 40,847 lbs of glucose was fed over the duration of this run. Started chilling to 48° F on 12-28-11 at log hour 73. Started the harvest at log hour 85.

- * ph adjusted chlorides before filtering.

F4-1-12

#	DATE POSTED	PROD ORDER #	VESSEL/ RUN#	Origin	Batch Volume (L)	Final Tank Volume(L)	BIOMASS g/L	Volume Adjusted g/L	% FAT
5	20120116	400538.1	SL F4-1-12	Seed	220,000	231,400	68.69	72.25	68.53

(SL-F4-1-12) was inoculated on 01-09-12 (from SV3 @ log hour). 2220.2 liters of fed batch media was fed over a 32 hour period. 42,343 liters of glucose was fed over the duration of this run. Started chilling to 48° F on 01-12-12 at log hour 74 and sending half to F2 to assist in chilling. Started centrifuging at log hour 79 from F4 first.

FIGURE 1 CONTINUED

F6-2-12

# 2012	DATE POSTED	PROD ORDER #	VESSEL/ RUN#	Origin	Batch Volume (L)	Final Tank Volume(L)	BIOMASS g/L	Volume Adjusted g/L	% FAT
6	20120120	400684.1	SL-F6-2-12	Seed	216,000	237,200	76.27	83.76	69.13

(SL-F6-2-12) was inoculated on 01-12-12 (from SV3 @ log hour 43). 2223.4 liters of fed batch media was fed over a 32 hour period. 57,288 Liters of glucose was fed over the duration of this run. Started chilling to 48° F on 01-15-12 at log hour 85 and sending half to F2 to assist in chilling. Started centrifuging at log hour 89 from F6 first.

F5-2-12

# 2012	DATE POSTED	PROD ORDER #	VESSEL/ RUN#	Origin	Batch Volume (L)	Final Tank Volume(L)	BIOMASS g/L	Volume Adjusted g/L	% FAT
7	20120126	400940.1	SL-F5-2-12	Seed	224,000	241,120	76.62	82.48	75

(SL-F5-2-12) was inoculated on 01-16-12 (from SL-F6-2-12 @ log hour 85). 2218.7 liters of fed batch media was fed over a 32 hour period. 55,998 liters of glucose was fed over the duration of this run. Started chilling to 48° F on 01-20-12 at log hour 97 and sending half to F2 to assist in chilling. Started centrifuging at log hour 117 from F5 first.

F4-2-12

# 2012	DATE POSTED	PROD ORDER #	VESSEL/ RUN#	Origin	Batch Volume (L)	Final Tank Volume(L)	BIOMASS g/L	Volume Adjusted g/L	% FAT
8	20120130	401149.1	SL-F4-2-12	Seed	220,000	231,000	65.54	68.82	69.1

(SL-F4-2-12) was inoculated on 01-20-12 (from SV-3 @ log hour 47). 2215.4 liters of fed batch media was fed over a 32 hour period. 40,744 liters of glucose was fed over the duration of this run. Started chilling to 48° F on 01-23-12 at log hour 73. Started centrifuging at log hour 161.

FIGURE 1 CONTINUED

- Harvest was delayed due to the spray dryer issues.

F6-3-12

# 2012	DATE POSTED	PROD ORDER #	VESSEL/RUN#	Origin	Batch Volume (L)	Final Tank Volume(L)	BIOMASS g/L	Volume Adjusted g/L	% FAT
9	20120209	401534.1	SL-F6-3-12	Seed	220,000	229,720	56.16	58.64	69.34

(SL-F6-3-12) was inoculated on 02-01-12 (from SV3 @ log hour 46). 2215.6 liters of fed batch media was fed over a 32 hour period. 35,494 liters of glucose was fed over the duration of this run. Started chilling and harvesting on 02-04-12 at log hour 78. Harvested straight to centrifuges at log hour 94 and did not use F2 as a harvest tank.

- Temperature excursion from log hour 13 to 21 due to temperature control in ROUT mode and not RCAS mode. Modifications were made to the procedure to ensure the temperature control is placed in RCAS mode when batching is started.

F5-3-12

# 2012	DATE POSTED	PROD ORDER #	VESSEL/RUN#	Origin	Batch Volume (L)	Final Tank Volume(L)	BIOMASS g/L	Volume Adjusted g/L	% FAT
10	20120215	401824.1	SL-F5-3-12	Seed	220,000	224,300	59.62	60.79	67.28

(SL-F5-3-12) was inoculated on 02-07-12 (from SV3 @ log hour 46). 2214.9 liters of fed batch media was fed over a 32 hour period. 36,746 liters of glucose was fed over the duration of this run. Started chilling and harvesting on 02-11-12 at log hour 93. Harvested straight to centrifuges and did not use F2 as a harvest tank.

F1-2-12

# 2012	DATE POSTED	PROD ORDER #	VESSEL/RUN#	Origin	Batch Volume (L)	Final Tank Volume(L)	BIOMASS g/L	Volume Adjusted g/L	% FAT
11	20120229	402398.1	SL-F1-2-12	Seed	80,000	83,600	89.65	93.68	71.09

FIGURE 1 CONTINUED

(SL-F1-2-12) was inoculated on 02-22-12 (from G1 @ log hour 54). 797.9 liters of fed batch media was fed over a 32 hour period. 48,871 lbs of glucose was fed over the duration of this run. Started chilling to 48° F on 12-28-11 at log hour 72. Started the harvest at log hour 81.

F1-4-12

# 2012	DATE POSTED	PROD ORDER #	VESSEL/ RUN#	Origin	Batch Volume (L)	Final Tank Volume(L)	BIOMASS g/L	Volume Adjusted g/L	% FAT
18	20120328	403430.1	SL-F1-4-12	Seed	80,000	89,200	90.29	100.67	68.42

(SL-F1-4-12) was inoculated on 03-22-12 (from G1 @ log hour 71). 803.6 liters of fed batch media was fed over a 34 hour period. 59,067 lbs of glucose was fed over the duration of this run. Started chilling to 48° F on 03-25-12 at log hour 72. Started centrifuging at log hour 83.

F3-4-12

# 2012	DATE POSTED	PROD ORDER #	VESSEL/ RUN#	Origin	Batch Volume (L)	Final Tank Volume(L)	BIOMASS g/L	Volume Adjusted g/L	% FAT
27	20120501	404568.1	SL-F3-4-12	Seed	120,000	129,200	85.00	91.52	70.93

(SL-F3-4-12) was inoculated on 04-25-12 (from G1 @ log hour 67). 1193.8 liters of fed batch media was fed over a 34 hour period. 92,224 lbs of glucose was fed over the duration of this run. Started chilling to 48° F on 04-28-12 at log hour 72. Started centrifuging at log hour 89.

F6-7-12

# 2012	DATE POSTED	PROD ORDER #	VESSEL/ RUN#	Origin	Batch Volume (L)	Final Tank Volume(L)	BIOMASS g/L	Volume Adjusted g/L	% FAT
28	20120507	404695.1	SL-F6-7-12	Seed	220,000	241,580	73.37	80.57	70.95

(SL-F6-7-12) was inoculated on 04-27-12 (from SV-3 @ log hour 77). 2217.2 liters of fed batch media was fed over a 34 hour period. 53,951 of glucose was fed over the duration of this run. Started chilling to 48° F on 04-30-12 at log hour 81. Started centrifuging at log hour 108.

FIGURE 1 CONTINUED

F1-8-12

# 2012	DATE POSTED	PROD ORDER #	VESSEL/ RUN#	Origin	Batch Volume (L)	Final Tank Volume(L)	BIOMASS g/L	Volume Adjusted g/L	% FAT
29	20120508	404849.1	SL-F1-8-12	Seed	80,000	89,300	89.04	99.39	72.08

(SL-F1-8-12) was inoculated on 04-30-12 (from G1A @ log hour 74). 795.5 liters of fed batch media was fed over a 34 hour period. 53,393 lbs of glucose was fed over the duration of this run. Started chilling to 48° F on 05-03-12 at log hour 72. Started centrifuging at log hour 122.

- Run using antifoam ESP FC 131. It appeared to work well in F1.
- Problems occurred spray drying. The product was very sticking and not flowing well. 260 kilos of oily clumps was lost in the sifter overflow. The product from the sifter overflow could not be recovered. The dryer also had an oily product build up.

F3-6-12

# 2012	DATE POSTED	PROD ORDER #	VESSEL/ RUN#	Origin	Batch Volume (L)	Final Tank Volume(L)	BIOMASS g/L	Volume Adjusted g/L	% FAT
31	20120525	405450.1	SL-F3-6-12	Seed	120,000	123,800	74.09	76.44	72.15

(SL-F3-6-12) was inoculated on 05-18-12 (from G1 @ log hour 89). 1201.5 liters of fed batch media was fed over a 34 hour period. 78,211 lbs of glucose was fed over the duration of this run. Started chilling to 48° F on 05-21-12 at log hour 72. Started centrifuging at log hour 84.

- Using ESP FC 131 Antifoam.

F3-7-12

# 2012	DATE POSTED	PROD ORDER #	VESSEL/ RUN#	Origin	Batch Volume (L)	Final Tank Volume(L)	BIOMASS g/L	Volume Adjusted g/L	% FAT
32	20120531	405587.1	SL-F3-7-12	Seed	120,000	126,800	78.12	82.55	69.63

(SL-F3-7-12) was inoculated on 05-24-12 (from G1 @ log hour 72). 1197 liters of fed batch media was fed over a 34 hour period. 80,494 lbs of glucose was fed over the duration of this run. Started chilling to 48° F on 05-21-12 at log hour 72. Started centrifuging at log hour 83.

FIGURE 1 CONTINUED

- Using ESP FC 131 Antifoam.
- Foam out around log hour 15-16. Lost approximately 2,000 liter.
- Lost unknown amount during harvest due to CT-2 sample port being left open. NCR issued.

F3-8-12

# 2012	DATE POSTED	PROD ORDER #	VESSEL/ RUN#	Origin	Batch Volume (L)	Final Tank Volume(L)	BIOMASS g/L	Volume Adjusted g/L	% FAT
33	20120605	405739.1	SL-F3-8-12	Seed	120,000	126,900	66.06	69.86	71.77

(SL-F3-8-12) was inoculated on 05-30-12 (from G1A @ log hour 73). 1209 liters of fed batch media was fed over a 34 hour period. 70,747 lbs of glucose was fed over the duration of this run. Started chilling to 48° F on 06-02-12 at log hour 72. Started centrifuging at log hour 81.

F3-9-12

# 2012	DATE POSTED	PROD ORDER #	VESSEL/ RUN#	Origin	Batch Volume (L)	Final Tank Volume(L)	BIOMASS g/L	Volume Adjusted g/L	% FAT
34	20120612	405946.1	SL-F3-9-12	Seed	120,000	131,900	79.18	87.03	69.18

(SL-F3-9-12) was inoculated on 06-05-12 (from G1 @ log hour 73). 1199.5 liters of fed batch media was fed over a 34 hour period. 87,424 lbs of glucose was fed over the duration of this run. Started chilling to 48° F on 06-05-12 at log hour 72. Started centrifuging at log hour 86.

FIGURE 2

a) F1-2-11

<u>F1-2-11</u>	
FATTY ACID PROFILE	
TEST	RESULTS
C 06:0 (Caproic acid)	<0.10 %
C 07:0 (Heptanoic acid)	<0.10 %
C 08:0 (Caprylic acid)	<0.10 %
C 09:0 (Nonanoic acid)	<0.10 %
C 10:0 (Capric acid)	<0.10 %
C 11:0 (Undecanoic acid)	<0.10 %
C 12:0 (Lauric acid)	<0.10 %
C 13:0 (Tridecanoic acid)	<0.10 %
C 14:0 (Myristic acid)	4.01%
C 14:1 (Myristoleic acid)	1.35%
C 15:0 (Pentadecanoic acid)	<0.10 %
C 15:1 (Pentadecenoic acid)	<0.10 %
C 16:0 (Palmitic acid)	54.42%
C 16:1 (Palmitoleic acid)	<0.10 %
C 17:0 (Margaric acid)	0.51%
C 17:1 (Margaroleic acid)	<0.10 %
C 18:0 (Stearic acid)	1.81%
C 18:1n7 (Vaccenic acid)	<0.10 %
C 18:1n9 (Oleic acid)	<0.10 %
C 18:1n9t (Elaidic acid)	<0.10 %
C 18:2n6 (Linoleic acid)	<0.10 %
C 18:2n6t (Linolelaidic acid)	<0.10 %
C 18:3n3 (alpha-Linolenic)	<0.10 %
C 18:3n6 (gamma-Linolenic)	<0.10 %
C 19:0 (Nonadecanoic acid)	<0.10 %
C 20:0 (Arachidic acid)	0.31%
C 20:1 (Eicosenoic acid)	<0.10 %
C 20:2n6 (Eicosadienoic acid)	<0.10 %
C 20:3n3 (Eicosatrienoic acid)	<0.10 %
C 20:3n6 (homo-gamma-Linolenic acid)	<0.10 %
C 20:4n6 (Arachidonic acid)	<0.10 %
C 20:5n3 (Eicosapentaenoic acid)	0.37%
C 21:0 (Heneicosanoic acid)	<0.10 %
C 22:0 (Behenic acid)	0.18%
C 22:1 (Erucic acid)	0.63%
C 22:2n6 (Docosadienoic acid)	0.45%

FIGURE 2 CONTINUED

C 22:5n3 (Docosapentaenoic acid)	<0.10 %
C 22:6n3 (Docosahexaenoic acid)	27.22%
C 23:0 (Tricosanoic acid)	<0.10 %
C 24:0 (Lignoceric acid)	<0.10 %
C 24:1 (Nervonic acid)	<0.10 %
Unknown Components	0.95%

b) F1-9-11

<u>F1-9-11</u>	
FATTY ACID PROFILE	
TEST	RESULTS
C 06:0 (Caproic acid)	<0.10 %
C 07:0 (Heptanoic acid)	<0.10 %
C 08:0 (Caprylic acid)	<0.10 %
C 09:0 (Nonanoic acid)	<0.10 %
C 10:0 (Capric acid)	<0.10 %
C 11:0 (Undecanoic acid)	<0.10 %
C 12:0 (Lauric acid)	<0.10 %
C 13:0 (Tridecanoic acid)	<0.10 %
C 14:0 (Myristic acid)	4.15%
C 14:1 (Myristoleic acid)	1.51%
C 15:0 (Pentadecanoic acid)	<0.10 %
C 15:1 (Pentadecenoic acid)	<0.10 %
C 16:0 (Palmitic acid)	55.50%
C 16:1 (Palmitoleic acid)	<0.10 %
C 17:0 (Margaric acid)	0.53%
C 17:1 (Margaroleic acid)	<0.10 %
C 18:0 (Stearic acid)	1.77%
C 18:1n7 (Vaccenic acid)	<0.10 %
C 18:1n9 (Oleic acid)	<0.10 %
C 18:1n9t (Elaidic acid)	<0.10 %
C 18:2n6 (Linoleic acid)	<0.10 %
C 18:2n6t (Linolelaidic acid)	<0.10 %
C 18:3n3 (alpha-Linolenic)	<0.10 %
C 18:3n6 (gamma-Linolenic)	<0.10 %
C 19:0 (Nonadecanoic acid)	<0.10 %
C 20:0 (Arachidic acid)	0.30%
C 20:1 (Eicosenoic acid)	<0.10 %
C 20:2n6 (Eicosadienoic acid)	<0.10 %
C 20:3n3 (Eicosatrienoic acid)	<0.10 %
C 20:3n6 (homo-gamma-Linolenic acid)	<0.10 %

FIGURE 2 CONTINUED

C 20:4n6 (Arachidonic acid)	<0.10 %
C 20:5n3 (Eicosapentaenoic acid)	0.13%
C 21:0 (Heneicosanoic acid)	<0.10 %
C 22:0 (Behenic acid)	<0.10 %
C 22:1 (Erucic acid)	0.58%
C 22:2n6 (Docosadienoic acid)	0.43%
C 22:5n3 (Docosapentaenoic acid)	<0.10 %
C 22:6n3 (Docosahexaenoic acid)	27.03%
C 23:0 (Tricosanoic acid)	<0.10 %
C 24:0 (Lignoceric acid)	<0.10 %
C 24:1 (Nervonic acid)	<0.10 %
Unknown Components	0.57%

c) F1-5-11

<u>F1-5-11</u>	
FATTY ACID PROFILE	
TEST	RESULTS
C 06:0 (Caproic acid)	<0.10 %
C 07:0 (Heptanoic acid)	<0.10 %
C 08:0 (Caprylic acid)	<0.10 %
C 09:0 (Nonanoic acid)	<0.10 %
C 10:0 (Capric acid)	<0.10 %
C 11:0 (Undecanoic acid)	<0.10 %
C 12:0 (Lauric acid)	<0.10 %
C 13:0 (Tridecanoic acid)	<0.10 %
C 14:0 (Myristic acid)	3.42%
C 14:1 (Myristoleic acid)	1.92%
C 15:0 (Pentadecanoic acid)	<0.10 %
C 15:1 (Pentadecenoic acid)	<0.10 %
C 16:0 (Palmitic acid)	54.15%
C 16:1 (Palmitoleic acid)	<0.10 %
C 17:0 (Margaric acid)	0.85%
C 17:1 (Margaroleic acid)	<0.10 %
C 18:0 (Stearic acid)	1.80%
C 18:1n7 (Vaccenic acid)	<0.10 %
C 18:1n9 (Oleic acid)	<0.10 %
C 18:1n9t (Elaidic acid)	<0.10 %
C 18:2n6 (Linoleic acid)	<0.10 %
C 18:2n6t (Linolelaidic acid)	<0.10 %
C 18:3n3 (alpha-Linolenic)	<0.10 %
C 18:3n6 (gamma-Linolenic)	<0.10 %

FIGURE 2 CONTINUED

C 19:0 (Nonadecanoic acid)	<0.10 %
C 20:0 (Arachidic acid)	0.23%
C 20:1 (Eicosenoic acid)	<0.10 %
C 20:2n6 (Eicosadienoic acid)	<0.10 %
C 20:3n3 (Eicosatrienoic acid)	<0.10 %
C 20:3n6 (homo-gamma-Linolenic acid)	<0.10 %
C 20:4n6 (Arachidonic acid)	<0.10 %
C 20:5n3 (Eicosapentaenoic acid)	0.33%
C 21:0 (Heneicosanoic acid)	<0.10 %
C 22:0 (Behenic acid)	<0.10 %
C 22:1 (Erucic acid)	0.38%
C 22:2n6 (Docosadienoic acid)	0.42%
C 22:5n3 (Docosapentaenoic acid)	<0.10 %
C 22:6n3 (Docosahexaenoic acid)	27.34%
C 23:0 (Tricosanoic acid)	<0.10 %
C 24:0 (Lignoceric acid)	<0.10 %
C 24:1 (Nervonic acid)	<0.10 %
Unknown Components	0.62%

d) F1-14-11

<u>F1-14-11</u>	
FATTY ACID PROFILE	
TEST	RESULTS
C 06:0 (Caproic acid)	<0.10 %
C 07:0 (Heptanoic acid)	<0.10 %
C 08:0 (Caprylic acid)	<0.10 %
C 09:0 (Nonanoic acid)	<0.10 %
C 10:0 (Capric acid)	<0.10 %
C 11:0 (Undecanoic acid)	<0.10 %
C 12:0 (Lauric acid)	0.17%
C 13:0 (Tridecanoic acid)	<0.10 %
C 14:0 (Myristic acid)	4.57%
C 14:1 (Myristoleic acid)	<0.10 %
C 15:0 (Pentadecanoic acid)	1.44%
C 15:1 (Pentadecenoic acid)	<0.10 %
C 16:0 (Palmitic acid)	53.49%
C 16:1 (Palmitoleic acid)	0.14%
C 17:0 (Margaric acid)	0.45%
C 17:1 (Margaroleic acid)	<0.10 %
C 18:0 (Stearic acid)	1.67%
C 18:1n7 (Vaccenic acid)	<0.10 %

FIGURE 2 CONTINUED

C 18:1n9 (Oleic acid)	0.11%
C 18:1n9t (Elaidic acid)	<0.10 %
C 18:2n6 (Linoleic acid)	<0.10 %
C 18:2n6t (Linolelaidic acid)	<0.10 %
C 18:3n3 (alpha-Linolenic)	<0.10 %
C 18:3n6 (gamma-Linolenic)	<0.10 %
C 19:0 (Nonadecanoic acid)	<0.10 %
C 20:0 (Arachidic acid)	0.31%
C 20:1 (Eicosenoic acid)	<0.10 %
C 20:2n6 (Eicosadienoic acid)	<0.10 %
C 20:3n3 (Eicosatrienoic acid)	<0.10 %
C 20:3n6 (homo-gamma-Linolenic acid)	0.15%
C 20:4n6 (Arachidonic acid)	0.86%
C 20:5n3 (Eicosapentaenoic acid)	0.31%
C 21:0 (Heneicosanoic acid)	<0.10 %
C 22:0 (Behenic acid)	0.17%
C 22:1 (Erucic acid)	<0.10 %
C 22:2n6 (Docosadienoic acid)	<0.10 %
C 22:5n3 (Docosapentaenoic acid)	<0.10 %
C 22:6n3 (Docosahexaenoic acid)	27.33%
C 23:0 (Tricosanoic acid)	<0.10 %
C 24:0 (Lignoceric acid)	0.14%
C 24:1 (Nervonic acid)	0.22%
Unknown Components	1.42%

e) F1-15-11

<u>F1-15-11</u>	
FATTY ACID PROFILE	
TEST	RESULTS
C 06:0 (Caproic acid)	<0.10 %
C 07:0 (Heptanoic acid)	<0.10 %
C 08:0 (Caprylic acid)	<0.10 %
C 09:0 (Nonanoic acid)	<0.10 %
C 10:0 (Capric acid)	<0.10 %
C 11:0 (Undecanoic acid)	<0.10 %
C 12:0 (Lauric acid)	0.16%
C 13:0 (Tridecanoic acid)	<0.10 %
C 14:0 (Myristic acid)	4.43%
C 14:1 (Myristoleic acid)	0.18%
C 15:0 (Pentadecanoic acid)	1.17%
C 15:1 (Pentadecenoic acid)	<0.10 %

FIGURE 2 CONTINUED

C 16:0 (Palmitic acid)	55.87%
C 16:1 (Palmitoleic acid)	0.13%
C 17:0 (Margaric acid)	0.40%
C 17:1 (Margaroleic acid)	<0.10 %
C 18:0 (Stearic acid)	1.62%
C 18:1n7 (Vaccenic acid)	<0.10 %
C 18:1n9 (Oleic acid)	<0.10 %
C 18:1n9t (Elaidic acid)	<0.10 %
C 18:2n6 (Linoleic acid)	<0.10 %
C 18:2n6t (Linolelaidic acid)	<0.10 %
C 18:3n3 (alpha-Linolenic)	<0.10 %
C 18:3n6 (gamma-Linolenic)	<0.10 %
C 19:0 (Nonadecanoic acid)	<0.10 %
C 20:0 (Arachidic acid)	0.28%
C 20:1 (Eicosenoic acid)	<0.10 %
C 20:2n6 (Eicosadienoic acid)	<0.10 %
C 20:3n3 (Eicosatrienoic acid)	0.90%
C 20:3n6 (homo-gamma-Linolenic acid)	0.13%
C 20:4n6 (Arachidonic acid)	<0.10 %
C 20:5n3 (Eicosapentaenoic acid)	0.29%
C 21:0 (Heneicosanoic acid)	<0.10 %
C 22:0 (Behenic acid)	0.15%
C 22:1 (Erucic acid)	<0.10 %
C 22:2n6 (Docosadienoic acid)	0.43%
C 22:5n3 (Docosapentaenoic acid)	<0.10 %
C 22:6n3 (Docosahexaenoic acid)	26.92%
C 23:0 (Tricosanoic acid)	<0.10 %
C 24:0 (Lignoceric acid)	<0.10 %
C 24:1 (Nervonic acid)	0.22%
Unknown Components	0.65%

FIGURE 3

ALLTECH QUALITY ASSURANCE LABORATORIES

Typical Fatty Acid Profile of ALGAE-S Meal

Fatty Acid	% of Fat content
Caproic Acid	<0.10%
Heptanoic Acid	<0.10%
Caprylic Acid	<0.10%
Nonanoic Acid	<0.10%
Capric Acid	<0.10%
Undecanoic Acid	<0.10%
Lauric Acid	<0.10%
Tridecanoic Acid	<0.10%
Myristic Acid	3.86%
Myristoleic Acid	1.60%
Pentadecanoic Acid	<0.10%
Palmitic Acid	54.69%
Palmitoleic Acid	<0.10%
Margaric Acid	0.63%
Margaroleic Acid	<0.10%
Stearic Acid	1.80%
Vaccenic Acid	<0.10%
Oleic Acid	<0.10%
Elaidic Acid	<0.10%
Linoleic Acid	<0.10%
Linolelaidic Acid	<0.10%
Alpha-Linoleic Acid	<0.10%
Gamma-Linoleic Acid	<0.10%
Nonadecanoic Acid	<0.10%
Arachidic Acid	0.28%
Eicosenoic Acid	<0.10%
Eicosadienoic Acid	<0.10%
Eicosatrienoic Acid	<0.10%
Homo-gamma-Linoleic Acid	<0.10%
Arachidonic Acid	<0.10%
Eicosapentaenoic Acid	0.28%
Heneicosanoic Acid	<0.10%
Behenic Acid	<0.10%
Erucic Acid	0.53%
Docosadienoic Acid	0.43%
Docosapentaenoic Acid	<0.10%
Docosahexaenoic Acid	27.20%
Tricosanoic Acid	<0.10%
Lignoceric Acid	<0.10%
Nervonic Acid	<0.10%
Unknown	0.71%

**COMPOSICIONES DE LÍPIDOS ALGALES Y MÉTODOS PARA
PREPARARLAS Y UTILIZARLAS**

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a composiciones
que comprenden algas con un alto contenido de lípidos y
métodos para prepararlas y utilizarlas. En particular, la
presente invención se relaciona con biomasa de alga con un
alto contenido de lípidos y materiales lipídicos algaes
10 derivados del mismo, métodos para prepararlos, así como con
biocombustibles (por ejemplo, biodiesel) y composiciones
alimenticias (por ejemplo, alimento para animales) que
comprenden o están preparadas por los mismos. Las
composiciones y métodos de la presente invención encuentran
15 su uso en una variedad de aplicaciones que incluyen
aplicaciones de biocombustibles, alimenticias (por ejemplo,
nutrición en humanos y animales), terapéuticas, así como de
investigación.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20 En los últimos años, la producción de
biocombustibles (por ejemplo, biodiesel) de las algas ha sido
un área de interés. En parte, esto se debe a que en las
tierras agrícolas de alta calidad no es necesario cultivar
25 algas (biomasa de algas). Sin embargo, la producción

comercial del biocombustible (por ejemplo, biodiesel) de las algas ha seguido siendo un desafío.

Además, durante los últimos cincuenta años, los acercamientos para proveer alimentación animal ha cambiado.

5 Los animales ya no son alimentados con cualquier forraje u otro material que pudiera estar disponible. En lugar de eso, la dieta de los animales está monitoreada muy de cerca para un valor total de nutrición y costo. Muy frecuentemente, los animales con dietas específicas son monitoreados por las

10 características de calidad y rendimiento con los componentes nutricionales del alimento ajustado para maximizar el valor nutricional y la optimización de las características de rendimiento de los animales.

Sin embargo, el costo es un factor crítico. Hay una

15 búsqueda continua de alimento animal rentable, no solo para sostener a los animales, pero en muchos casos para causar un crecimiento y un valor

OBJETO DE LA INVENCION

20 La presente invención se refiere a composiciones que comprenden algas con contenido de lípidos y métodos para prepararlas y utilizarlas. En particular la invención se refiere a biomasa de algas con alto contenido de lípidos y materiales de los lípidos de algas derivados del mismo,

25 métodos para hacerlo, así como los biocombustibles (como el

biodiesel) y composiciones de dietas (como alimento para animales) que comprende o fue hecho por el mismo. Composiciones y métodos de la invención encuentran uso en una gran variedad de aplicaciones incluyendo los biocombustibles, alimenticio (como en la nutrición para humanos y animales) terapéuticos así como aplicaciones de investigación.

Por consiguiente, la invención provee un proceso para hacer un biocombustible de algas que comprende, de manera deseada, un alto contenido de grasa (por lo menos 67% de grasa total) que comprende cultivar un alga bajo circunstancias de cultivo suficiente para proveer biomasa de algas que comprende un deseado alto contenido en grasa. La invención ha identificado condiciones de cultivo bajo las cuales es posible obtener una biomasa de algas que comprende un deseado alto contenido en grasa (por lo menos 67% de grasa total). La invención no está limitada al contenido total de grasa (por ejemplo por peso) de una biomasa de algas generada de acuerdo a la invención. En una modalidad, una biomasa de alga generada y/o usada de acuerdo a la invención comprende un contenido de grasa de al menos 67% por peso. Sin embargo, la invención también provee composiciones y métodos para generar una biomasa de alga conteniendo mayor (por ejemplo, mayor que el 68%, mayor que el 69%, mayor que el 70%, mayor que el 71%, mayor que el 72%, mayor que el 73%, mayor que el 74%, mayor que el 75%, mayor que el 76%, mayor que el 77%,

mayor que el 78%, mayor que el 79%, mayor que el 80%, mayor que el 81%, mayor que el 82%, mayor que el 85%, o más) o menor (por ejemplo, cerca del 66%, cerca del 65%, cerca del 64%, cerca del 63%, cerca del 62%, cerca del 61%, cerca del 5 60%, cerca del 59%, cerca del 58%, cerca del 57%, cerca del 56%, cerca del 55%, cerca del 54%, o menos) cantidad de grasa total. En efecto, los métodos y las composiciones descritas aquí pueden ser utilizados para generar una biomasa de alga conteniendo cualquier nivel deseado de contenido de grasa 10 total. En algunas modalidades, la biomasa de alga es cultivada en dos o más tipos de medios de cultivo de manera secuencial. Por ejemplo, en algunas modalidades, uno de los dos o más medios de cultivo contiene 50 g/L de una fuente de carbón, cerca de 7.5 g/L de extracto de levadura, cerca de 15 0.15 g/L de sulfato de magnesio, cerca de 0.15 g/L de cloruro de calcio y 0.15 g/L de cloruro de magnesio. La invención no está limitada por la fuente de carbón. De hecho, una gran cantidad de fuentes de carbón pueden ser utilizadas incluyendo, pero no limitada a, carbohidratos tales como la 20 glucosa, la fructuosa, xilosa, sacarosa, maltosa o almidón soluble tal como el ácido oleico grasas tales como aceite de soya, melaza, glicerol, manitol y acetato de sodio, harina de semilla de algodón, glicerol, melazas y licor de maíz. En algunas modalidades, otro medio de cultivo de los dos o más 25 medios de cultivo contiene 50 g/L de una fuente de carbón,

cerca de 7.5 g/L de extracto de levadura, cerca de 4.0 g/L de sulfato de magnesio, cerca de 1 g/L de urea, cerca de 2 g/L de cloruro de calcio, cerca de 2 g/L de cloruro de magnesio y cerca de 0.25 g/L fosfato mono potásico. En algunas modalidades, un medio de cultivo de los dos o más medios contiene una fuente de carbono, extracto de levadura y sal de mar. En algunas modalidades, y así como están descritas aquí mismo, las algas son cultivadas en un primer medio de cultivo (por ejemplo conteniendo glucosa, extracto de levadura y sal de mar); transferidas a una incubadora en un segundo medio de cultivo (por ejemplo conteniendo glucosa, extracto de levadura, sulfato de magnesio, cloruro de calcio y cloruro de magnesio); y transferidas a una incubadora en un tercer medio de cultivo (por ejemplo, conteniendo glucosa, extracto de levadura, sulfato de magnesio, urea, calcio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio y fosfato mono potásico). En algunas modalidades, uno de los medios de cultivo se complementa con una alimentación de lote alimentado. En una modalidad preferida, el tercer medio de cultivo es complementado con una alimentación de lote alimentado. La invención no está limitada por el tipo, o la duración, de la alimentación de lote alimentado utilizado. En algunas modalidades, el alimentación de lote alimentado comprende urea y fosfato mono potásico. La invención no está limitada por la cantidad y/o relaciones en componentes en los medios

usados en los cultivos. Ejemplos que pueden ser utilizados como componentes de cada uno de los diversos medios (por ejemplo, el primer medio de cultivo, el segundo medio de cultivo, medio de lotes y el medio de lote alimentado) son descritos a detalle aquí mismo. En algunas modalidades, la biomasa de algas es cosechada de un cultivo (por ejemplo del tercer medio de cultivo) entre 12-24 horas después del cese del proceso del lote alimentado. En algunas modalidades, la biomasa de algas es cosechada del tercer medio de cultivo después de que han sido removidos/consumidos todos los nutrientes del medio. La invención no está limitada por la forma en que la biomasa de algas es cosechada. De hecho, una gran variedad de formas pueden ser usadas para cosechar la biomasa incluyendo, pero no limitadas a, los métodos aquí descritos. En algunas modalidades el medio de cultivo que comprende la biomasa de algas es refrigerado antes de cosecharse. La invención no está limitada por la temperatura a la que se enfría el medio de cultivo que contiene la biomasa de algas antes de cosecharla. De hecho una gran variedad de temperaturas pueden ser usadas incluyendo, pero no limitado a, las descritas aquí mismo. En algunas modalidades el medio de cultivo que contiene la biomasa de algas se enfría entre los 5 y 25 C. La invención no está limitada por el tipo de alga usada en la invención. De hecho, pueden usarse una gran variedad de algas (independientemente

o en combinación) incluyendo, pero no limitado a, aquellas descritas aquí mismo. En algunas modalidades, las algas son una variedad o una especie del género *Chlorella*, del género *Schizochytrium*, o del género *Crypthecodinium*. En una
5 modalidad preferida, la alga es *Schizochytrium limacinum*. En algunas modalidades, el primer medio de cultivo contiene cerca de 50 g/L de glucosa, cerca de 10 g/L de extracto de levadura y cerca de 4 g/L de sal de mar. En algunas modalidades el segundo medio de cultivo contiene cerca de 50
10 g/L de cloruro de calcio, cerca de 7.5 g/L de extracto de levadura, cerca de 0.15 g/L de sulfato de magnesio, cerca de 0.15 g/L de cloruro de calcio y 0.15 g/L de cloruro de magnesio. En algunas modalidades, el tercer medio de cultivo contiene cerca de 50 g/L de glucosa, cerca de 7.5 g/L de
15 extracto de levadura, cerca de 4.0 g/L de sulfato de magnesio, cerca de 1 g/L de urea, cerca de 2 g/L de cloruro de calcio, cerca de 2 g/L de cloruro de magnesio y cerca de 0.25 g/L de fosfato mono potásico. En algunas modalidades las condiciones del cultivo comprenden el funcionamiento del
20 cultivo del alga a 30 C bajo condiciones de flujo de aire y agitación a fin de mantener oxígeno disuelto a aproximadamente del 10%. En algunas modalidades, el tercer medio de cultivo (por ejemplo, el medio de cultivo presente al momento de la inoculación de un fermentador principal (por
25 ejemplo, un buque de 70,000 L, 120,000 L, 256,000 L))

contiene una relación inicial de nitrógeno (N):fosforo (P):potasio (K) de 46:13:8.5. En una modalidad preferida, la relación N:P:K es la misma en el modo de cultivo de lote y en el lote alimentado. En algunas modalidades la relación de magnesio (Mg):calcio (Ca) es 3:1 en el medio de cultivo usado en los dos modos, lote y lote alimentado, sin embargo relaciones más grandes (por ejemplo 4:1, 4.5:1 o más) o más pequeñas (por ejemplo 2.5:1, 2:1, 1.5:1, o más bajas) pueden ser usadas. En otras modalidades, la relación de cloruro (Cl₂):sulfato (SO₄) de 1:1 es usada en el medio de cultivo usado en los dos modos, lote y lote alimentado, sin embargo relaciones más grandes (por ejemplo 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 o más) y más bajas (por ejemplo, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 o más bajo) pueden ser utilizadas. En algunas modalidades la relación de sulfato (SO₄):fosfato (PO₄) en el medio al momento de la inoculación del fermentador principal (por ejemplo un buque de 70,000 L, 120,000 L, 256,000 L) es 16:1, aunque relaciones más grandes (por ejemplo, 20:1, 25:1, 30:1, 32:1, o más) y más bajas (por ejemplo, 10:1, 8:1, 5:1, 3:1 o más bajo) pueden ser utilizados. En algunas modalidades, la relación total de sulfato (SO₄):fosfato (PO₄) que ha sido agregada en lotes y alimentada al final de un cultivo completo (por ejemplo, incluyendo inóculo, primera etapa de semilla, segunda etapa de semilla y cultivos del fermentador principal) que genera una biomasa de alga conteniendo la

cantidad de grasa deseadas (por ejemplo, más del 67% de grasa) es 5.3:1, aunque relaciones más altas (por ejemplo, 5.5:1, 5.7:1, 6:1, 7:1, 8:1 o más alta) y más bajas (por ejemplo, 5:1, 4.5:1, 4:1, 3:1 o más baja) pueden ser usados.

5 En algunas modalidades la relación de cloruro (Cl₂):fosfato (PO₄) en el medio al momento de la inoculación del fermentador principal (por ejemplo un buque de 70,000 L, 120,000 L, 256,000 L) es 16:1 aunque relaciones más grandes (por ejemplo, 20:1, 25:1, 30:1, 32:1, o más) y más bajas (por

10 ejemplo, 10:1, 8:1, 5:1, 3:1 o más bajo) pueden ser utilizados. En algunas modalidades, la relación total de cloruro (Cl₂):fosfato (PO₄) que ha sido agregada en lotes y alimentada al final de un cultivo completo (por ejemplo, inóculo, primera etapa de semilla, segunda etapa de semilla y

15 el cultivo del fermentador principal) que genera una biomasa de alga con el contenido deseado de grasa (por ejemplo, mayor al 67% de grasa) es 5.3:1, aunque relaciones más grandes (por ejemplo, 5.5:1, 5.7:1, 6:1, 7:1, 8:1 o mas grandes) y más bajas (por ejemplo 5:1, 4.5:1, 4:1, 3:1 o más bajas) pueden

20 ser usadas.

La invención también provee una biomasa de algas que contiene una deseada, alta cantidad de grasa (por ejemplo, contenido de grasa total por lo menos de 67% por peso). En algunas modalidades, la biomasa comprende cerca de

25 170-250 mg/g de ácido docosahexaenoico (DHA) y/o cerca de

150-400 mg/g de ácido palmítico. En algunas modalidades, la invención provee una composición de lípidos, un producto alimenticio u otro material que comprende biomasa de algas (por ejemplo, biomasa de algas seco) o un componente de los mismos (por ejemplo, un componente de ácido graso de los mismos). En algunas modalidades, la biomasa de algas (por ejemplo, una biomasa de algas seca generada de acuerdo a los métodos descritos aquí mismo) contiene una cantidad deseada de grasa total y/u otros componentes (por ejemplo, mas grande que el 68% de grasa total, más grande que el 69% de grasa total, más grande que el 70% de grasa total, más grande que el 71% de grasa total, más grande que el 72% de grasa total, más grande que el 73% de grasa total, más grande que el 74% de grasa total, más grande que el 75% de grasa total, más grande que el 76% de grasa total, más grande que el 77% de grasa total, o más grande que el 78% de grasa total). En algunas modalidades una biomasa de algas de la invención (por ejemplo, conteniendo más de 67% de grasa total) se seca a tal grado para que la biomasa contenga menos del 5% de humedad (por ejemplo, menos de 4.5% de humedad, menos de 4% de humedad, menos de 3.5% de humedad, menos de 3% de humedad, menos de 2.5% de humedad, menos de 2% de humedad, o menos de 1.5% de humedad). En algunas modalidades, una biomasa de algas de la invención (por ejemplo, una biomasa seca que contenga menos del 5% de humedad) contiene cerca de 170-250

mg/g o más de ácido docosahexaenoico (DHA) (por ejemplo, cerca de 170-180 mg/g DHA, cerca de 170-180 mg/g DHA, cerca de 170-180 mg/g DHA, cerca de 180-190 mg/g DHA, cerca de 190-200 mg/g DHA, cerca de 200-210 mg/g DHA, cerca de 210-220 mg/g DHA, cerca de 220-230 mg/g DHA, cerca de 230-240 mg/g DHA, cerca de 240-250 mg/g DHA, o más de 250 mg/g DHA). En algunas modalidades una biomasa de algas de la invención (por ejemplo, una biomasa seca que contiene menos de 5% de humedad) contiene cerca de 150-400 mg/g o más de ácido palmítico (nombre IUPAC: ácido hexadecanoico (por ejemplo cerca de 150-200 mg/g, cerca de 200-225 mg/g, cerca de 225-250 mg/g, cerca de 250-275 mg/g, cerca de 275-300 mg/g, cerca de 300-325 mg/g, cerca de 325-350 mg/g, cerca de 350-375 mg/g, cerca de 375-400 mg/g, o más de 400 mg/g)). En algunas modalidades, una biomasa de algas de la invención (por ejemplo, una biomasa seca conteniendo menos del 5% de humedad) contiene cerca de 300-600 mg/g o más de ácido graso (por ejemplo, cerca de 300-350 mg/g, cerca de 350-400 mg/g, cerca de 450-500 mg/g, cerca de 500-550 mg/g, cerca de 550-600 mg/g, o más de 600 mg/g). En algunas modalidades, una biomasa de algas de la invención (por ejemplo, una biomasa seca que contiene menos del 5% de humedad) contiene menos del 15% de proteínas (por ejemplo, menos del 14% de proteínas, menos del 13% de proteínas, menos del 12% de proteínas, menos del 11% de proteínas, menos del 10% de proteínas, menos del

9% de proteínas, o menos del 8% de proteínas). En algunas modalidades, una biomasa de algas o componente del mismo, de la invención es usado para preparar biocombustible (por ejemplo, biodiesel). En algunas modalidades, una biomasa de algas o componente del mismo, de la invención es usado para preparar productos alimenticios (por ejemplo, alimentación animal o componente alimenticio).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1 representa los datos generados durante grandes escalas, producción de biomasa de algas heterotrófica de acuerdo a los aspectos de la invención

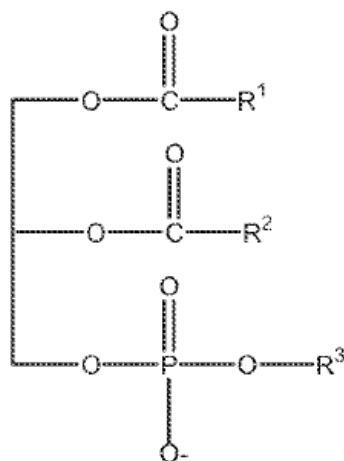
Figura 2 muestra el perfil del ácido graso de la biomasa de algas cosechada de varios cultivos de algas independientes a gran escala

Figura 3 muestra un perfil de un compuesto de ácido graso de biomasa cosechada utilizando los materiales y los métodos descritos aquí mismo.

DEFINICIONES

Tal como se usan aquí mismos, fosfolípido se refiere a un compuesto orgánico que tiene la siguiente estructura general:

5



Donde R1 es un residuo de acido graso, R2 es un
 10 residuo de acido graso o -OH, y R3 es un -H o nitrógeno que
 contiene compuesto colina ($\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{OH}^-$), etanolamina
 ($\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), inositol o serina. R1 y R2 no pueden ser OH
 simultáneamente. Cuando R3 es un -OH, el compuesto es un
 diacilglicerofosfato, mientras que cuando R3 es un compuesto
 15 que contenga nitrógeno, el compuesto es una fosfatida tal
 como la lecitina, cefalina, fosfatidil serina o plasmalógeno.

Un "éter fosfolípido" como es usado aquí mismo se
 refiere a un fosfolípido teniendo un enlace de éter en la
 posición 1 de la cadena del glicerol. Ejemplos de éter
 20 fosfolípido incluye, pero no se limita a,
 alcalacilfosfatidiletanolamina (AAPE), liso-
 alcalacilfosfatidicolina (LAAPC), y
 alcalacilfosfatadietanolamina (AAPE). Un "no éter
 fosfolípido" es un fosfolípido que no contiene un enlace de
 25 éter en la posición 1 de la cadena del glicerol.

Tal como es usado aquí mismo, el término "ácido graso omega-3" se refiere a ácidos grasos poli insaturados que tienen el doble enlace final en la cadena del hidrocarburo entre el tercer y cuarto átomo de carbono del metilo final de la molécula. Ejemplos no limitativos de los
 5 ácidos grasos omega-3 incluye, 5, 8, 11, 14, 17-ácido eicosapentaenoico (EPA), 4, 7, 10, 13, 16, 19-ácido docosahexanoico (DHA) y 7, 10, 13, 16, 19-ácido docosapentanoico (DPA).

10 Tal como es usado aquí mismo, los términos "triacylglycerol", "triglicérido" y "triacylglycerol" y "TAG" considérese como un éster derivado de un glicerol y tres ácidos grasos, donde "ácido graso" se refiere a un ácido carboxílico con una cola (cadena) alifática sin
 15 ramificaciones, que es saturada o insaturada. El ácido palmítico es un, ejemplo no limitado de un triglicérido.

Tal como es usado aquí mismo, los términos "% p/p (peso/peso)" y "p/p %" y gramaticalmente equivalentes se refiere a la cantidad (por ciento) de una sustancia dada en
 20 una composición sobre una base peso:peso. Por ejemplo, una composición que comprende 50% p/p fosfolípidos significa que la masa de los fosfolípidos es 50% del total de la masa de la composición (por ejemplo, 50 gramos de fosfolípidos en 100 gramos de la composición, tal como un aceite).

25 Tal como es usado aquí mismo el término "alga" se

refiere a un organismo unicelular o multicelular antes clasificado como planta, existiendo en agua salada o en agua fresca, autotrófico o heterotrófico, pero que carecen de verdaderos tallos, raíces y hojas. Tal como es usado aquí mismo el término "heterotrófico" se refiere a un organismo que no puede sintetizar su propia comida y es dependiente de sustancias orgánicas (por ejemplo sustancias orgánicas complejas y/o simples) para nutrición. Así, el término "alga heterotrófica" se refiere a un alga que no puede sintetizar su propia comida y es dependiente de sustancias orgánicas para nutrirse. Tal como es usado aquí mismo, el término "autotrófico" se refiere a un organismo capaz de sintetizar su propia comida de sustancias inorgánicas, usando la luz o energía química. El uso del término "algas" también se relaciona con micro alga y así abarca el significado de "micro algas". El término "composición de algas" se refiere a cualquier composición que contenga alga, tal como una composición acuática, y no está limitada al cuerpo de agua o al cultivo en donde las algas son cultivadas. Una composición de algas puede ser un cultivo de algas, biomasa de algas, un cultivo concentrado de algas o una masa deshidratada de algas, y puede ser en forma líquida, semisólida o sólida. Un composición de alga que no sea líquida puede ser descrita en termino de niveles de humedad o porcentaje en peso de los sólidos. Un "cultivo de algas" es una composición de algas

que comprende algas vivas. El término "algas" incluye macro algas (comúnmente conocidas como hierba de mar (seaweed)) y micro algas.

Tal como es usado aquí mismo, el término "biomasa de alga" o "biomasa" se refiere a una colección o masa de células de algas cultivadas en un área determinada o en un ecosistema en un determinado tiempo. El área o ecosistema puede ser un ambiente natural (por ejemplo, algún cuerpo de agua) o un medio ambiente sintético (por ejemplo, un fermentador o un bioreactor (puede ser abierto o cerrado)).

Tal como es usado aquí mismo, el término "grasa total" se refiere a la suma de los triglicéridos, fosfolípidos, éster de cera, y los esteroides presentes en un material. Por ejemplo, "grasa total" contenido en una biomasa de alfas se refiere a la suma de los triglicéridos, fosfolípidos, éster de cera y esteroides presentes en la biomasa. Adicionalmente, grasa total incluye a las dos grasas saturadas e insaturadas.

Tal como es usado aquí mismo, el término "conservador" se refiere a un agente que extiende la vida de almacenaje de los productos alimenticios o los no alimenticios, retardando o previniendo el deterioro, del sabor, olor, color, textura, apariencia, valor nutricional o seguridad. Un conservador necesita proveer una acción irreversible y letal resultando una destrucción celular

microbiana completa o incapacitación.

Agentes esterilizantes, sanitizantes, desinfectantes, esporicidas, virucidas y tuberculocidas proveen dicho modo de acción irreversible, algunas veces
5 conocido como acción "bactericida".

En contraste, un conservador puede proveer una acción bactericida o inhibidora que es reversible, en esa los microbios pueden continuar con su multiplicación si el conservador es removido. Las principales diferencias entre un
10 conservador y un sanitizador primordialmente involucra el modo de acción (un conservador previene el crecimiento en lugar de matar a los micro organismos) y tiempo de exposición (un conservador tiene de días hasta meses para actuar mientras que el sanitizador tiene cuando mucho algunos
15 minutos para actuar).

Tal como es usado aquí, el término "levadura" y "células de levadura" se refiere a micro organismos eucarióticos clasificados en el reino Fungi, que tengan una pared celular, membrana celular y componentes intracelulares.

20 Las levaduras no forman agrupamientos específicos filogenéticos o taxonómicos. Actualmente son conocidas cerca de 1,500 especies; se estima que solo el 1% de todas las especies de levaduras se han descrito. El término "levadura" es frecuentemente tomado como sinónimo para *S. cerevisiae*,
25 pero la diversidad filogenética de la levadura se muestra en

su colocación en las dos divisiones Ascomicota y Basidiomicota. Las levaduras de gemación ("levaduras verdaderas") son clasificadas en el orden de las Sacaromicetales. La mayoría de las especies de levaduras se reproducen de manera asexual por la gemación, aunque algunas se reproducen por fisión binaria. Las levaduras son unicelulares, aunque algunas especies se convierten multicelulares a través de la formación de una cadena de células de gemación conectadas conocidas como pseudohifas o hifas falsas. El tamaño de la levadura varía dependiendo de la especie, típicamente miden 3-4 μm en diámetro, aunque algunas levaduras pueden alcanzar más de los 40 μm .

Tal como es usado aquí mismo, los términos "levadura enriquecida con selenio" y "levadura selenizada" se refiere a cualquier levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*) que es cultivada en un medio que contiene sales inorgánicas de selenio. La presente invención no está limitada por la cantidad de sal de selenio utilizada. En efecto, una gran cantidad de sales de selenio son contempladas para ser utilizadas en la presente invención, pero no limitadas a, selenito de sodio, selenato de sodio, selenita de cobalto o selenato de cobalto. Selenometionina libre (por ejemplo las no asociadas con una levadura o una célula) puede también ser usada como la fuente de selenio para las levaduras enriquecidas en selenio como la levadura

hace para incorporar esta forma de selenio. Durante la
cultivación, debido a la similitud química entre el selenio y
el azufre, la levadura incorpora selenio en lugar del azufre
en productos orgánicos que normalmente contienen azufre
5 dentro de la célula. Un compuesto que contiene selenio tal
preparación de la levadura es el seleniometionina el cual
estará presente en una forma que se incorpora dentro de los
polipéptidos/proteínas. La cantidad total de selenio celular
presente en forma de selenometionina en dicha preparación
10 puede variar, pero puede ser entre 10 y 100%, 20-60%, 50-75%,
y entre 60 y 75%. El resto del selenio orgánico en la
preparación de la levadura selenizada es predominantemente
hecho de intermedios en la vía para la biosíntesis
seleniometionina. Esto incluye, pero no está limitado a,
15 selenocisteína, selenocistationina, selenohomocisteína y
selenoadenosilenometionina. La cantidad de sal de selenio
inorgánico residual en el producto final es generalmente
bastante baja (menor a 2%). Sin embargo la presente invención
no es limitada por este porcentaje, ya que preparaciones que
20 contienen mas (por ejemplo entre 2 y 70%) o menos (por
ejemplo entre 0.1 y 2%) también están comprendidas por la
invención.

Tal como es usado aquí mismo el termino "SEL-PLEX"
se refiera a una levadura seca, rica en selenio no viable
25 (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* con número de acceso

CNCM I-3060, Collection Nationale De Cultures De Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, Paris, Francia) cultivado en una fermentación de lote alimentado que provee cantidades incrementales de melazas de caña y sales de selenio de manera que minimizan los efectos perjudiciales de las sales de selenio en el rango de crecimiento de la levadura y permite incorporaciones optimas de selenio inorgánico en materia celular orgánica. El selenio inorgánico residual es eliminado (por ejemplo usando un riguroso proceso de lavado) y no excede el contenido total de selenio del 2%.

Tal como es usado aquí mismo, el término "selenio orgánico" se refiere a cualquier compuesto orgánico en donde el selenio reemplaza al azufre. Así, el selenio orgánico puede referirse a cualquier compuesto biosintetizado por levadura, o se puede referir a compuestos libres de selenio orgánicos que son sintetizados químicamente. Un ejemplo del último es libre de selenometionina.

Tal como es usado aquí mismo, el término "selenio inorgánico" generalmente se refiere a cualquier sal de selenio (por ejemplo, selenito de sodio, seleniato de sodio, selenito de cobalto y seleniato de cobalto). También hay una gran cantidad de otras fuentes de selenio inorgánico (Por ejemplo, aquellos listados en el índice del Merck). Levadura selenizada puede ser generada usando una fuente de selenio inorgánico incluyendo, pero no limitado a, selenito de sodio,

seleniato de sodio, selenito de cobalto, selenato de cobalto, ácido selénico, ácido selenioso, bromuro de selenio, cloruro de selenio, hexafluoruro de selenio, óxido de selenio, oxibromuro de selenio, oxiclорuro de selenio, oxifluoruro de selenio, sulfuros de selenio, tetrabromuro de selenio, tetracloruro de selenio y tetrafluoruro de selenio.

Tal como es usado aquí mismo, el término "pared celular de levadura" también referido como "YCW" se refiere a la pared celular de un organismo de levadura que rodea una membrana de plasma y a los componentes intercelulares de la levadura. Las paredes celulares de levadura incluyen a los dos, la capa externa (principalmente manosa) y la capa interna (principalmente glucano y quitina) de la pared celular de la levadura. Una función de la pared celular es la de proveer estructura y proteger el citoplasma activo metabólicamente. Vías de señalización y reconocimiento toman lugar en las paredes celulares de la levadura. La composición de la pared celular de la levadura varía de una cepa a otra y de acuerdo a las condiciones del crecimiento de la levadura.

Tal como es usado aquí mismo, el término "purificado" o "purificar" se refieren a la eliminación de componentes de una muestra. Por ejemplo, las paredes celulares de levadura o los extractos de las paredes celulares de levadura son purificados al remover los componentes que no sean las células de paredes de levadura

(por ejemplo, membranas de plasma y/o componentes intercelulares de la levadura); también son purificadps por la eliminación de los contaminantes u otros agentes diferentes a las paredes celulares de la levadura. La
5 remoción de componentes que no sean de las paredes celulares de levadura y/o contaminantes que no sean de las paredes celulares de levadura resulta en el incremento del porcentaje de las paredes celulares de levadura o los componentes del mismo en una muestra.

10 Tal como es usado aquí mismo, el término "in vivo" se refiere al estudio /o experimento realizado en un organismo vivo, ocurriendo en un organismo biológico.

Tal como es usado aquí mismo, el término "in vitro" se refiere a un medio ambiente artificial fuera del organismo
15 viviente y a procesos o reacciones biológicas que normalmente podrían ocurrir dentro de un organismo pero que son creados para que ocurran en un medio ambiente artificial. Medio ambiente in vitro puede comprender, pero no estar limitado a, tubos de ensayo y cultivos celulares.

20 Tal como es usado aquí mismo, el término "cromatografía líquida de alto rendimiento" y el término "HPLC" se refieren a una forma de cromatografía líquida para separar componentes. Los componentes son disueltos en soluciones. Los componentes son separados inyectando un tapón
25 de la mezcla de la muestra en la columna. Los instrumentos

HPLC comprenden una reserva de la fase móvil, una bomba, un inyector, una columna de separación y un detector. La presencia de analitos en el efluente de la columna es registrada por los cambios detectados cuantitativamente en un
5 índice refractario, absorción de UV-VIS de un conjunto de longitudes de ondas, fluorescencia después de la excitación con una longitud de onda adecuada, o respuesta electroquímica.

Tal como es usado aquí mismo, el término
10 "Microscopio electrónico de barrido" y el término "SEM" se refiere a un tipo de microscopio electrónico que muestra imágenes de la superficie de la muestra escaneándola con un rayo de electrones de alta energía en un patrón de exploración de trama. Los electrones interactúan con los
15 átomos que hacen que la muestra produzca señales que contienen información acerca de la topografía de la superficie de la muestra, composición y otras propiedades tales como la conductividad eléctrica.

Tal como es usado aquí mismo, el término "agente de
20 fijación" se refiere al químico que es capaz de fijar una sustancia con otra con el fin de "fijar", estabilizar, o de otra manera preservar la sustancia en su forma actual para prevenir que la sustancia se degrade o cambie. Frecuente los agentes de fijación son usados en el microscopio de barrido
25 electrónico (SEM) para prepara la muestra. El agente primario

de fijación: tal como es usado aquí, el termino "agente
primario de fijación" se refiere al primer agente de fijación
usado para "fijar" la sustancia. El agente secundario de
fijación; tal como es usado aquí mismo, el término "agente
5 secundario de fijación" se refiere al segundo agente de
fijación usado para "fijar" una sustancia. Agente terciario
de fijación; tal como es usado aquí mismo, el término "agente
terciario de fijación" el término "agente terciario de
fijación" se refiere al tercer agente de fijación usado para
10 "fijar" una sustancia.

Tal como es usado aquí mismo, el término "analito"
se refiere a un átomo, una molécula, un grupo de átomos y/o
moléculas, una sustancia, o un constituyente químico. Un
analito, no puede ser medido; más bien, otros aspectos o
15 propiedades del analito (físicos, químicos biológicos, etc)
pueden ser determinados usando un procedimiento analítico,
tal como el HPLC. Por ejemplo, uno puede medir una
"silla" (componente analito) por sí misma, pero la altura, el
ancho, etc. de la silla si puede ser medido. Igualmente, uno
20 no puede medir una micotoxina, pero puede medir la
fluorescencia relacionada con su concentración.

Tal como es usado aquí mismo, el término "señal" es
usado generalmente en referencia a cualquier proceso
detectable que indica que una reacción ha ocurrido (por
25 ejemplo, la unión entre el anticuerpo con el antígeno). Las

señales pueden ser evaluadas cualitativamente así como cuantitativamente. Ejemplos de tipos de "señales" incluyen, pero no se limitan a, señales radioactivas, señales fluorimétricas o producto colorimétrico/señales de reactivos.

5 Tal como es usado aquí mismo, el término "biodisponibilidad" se refiere a la fracción de una molécula o componente que está disponible para un organismo o alcanza la circulación sistémica. Cuando una molécula o un componente se administra de manera intravenosa, su biodisponibilidad es del 100%. Sin embargo, cuando una molécula o un componente se administra por otras rutas (oralmente) su biodisponibilidad desciende (debido a la absorción incompleta y al metabolismo del primer paso). En un ajuste nutricional, la biodisponibilidad se refiere a los rangos de absorción y utilización de un nutriente. Diferentes formas del mismo nutriente, por ejemplo, pueden tener diferentes biodisponibilidades..

20 Tal como se usa aquí mismo, el término "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad de una composición suficiente para afectar de manera deseada o benéfica el resultado. Una cantidad efectiva puede ser administrada y/o combinada con otro material en una o más administraciones, aplicaciones o dosis y no se prevé que esté limitada a una formulación en particular o ruta de administración.

25 Tal como es usado aquí mismo, el término

"digestión" se refiere a la conversión de comida u otro compuesto orgánico en una forma absorbible; para descomponer, suavizar, o romper por calor y humedad o una acción química.

Tal como es usado aquí mismo, el término "sistema
5 digestivo" se refiere a un sistema (incluyendo el sistema gastrointestinal) en donde se puede o se lleva a cabo la digestión.

Tal como es usado aquí mismo, el término "productos alimenticios" se refiere a materiales que son consumidos por
10 los mamíferos (humanos y animales) y contribuyen a la energía y/o nutriente de la dieta de los mamíferos. Ejemplos de productos alimenticios incluyen, pero no están limitados a, Ración Total Mezclada (TMR), forraje, pellets, concentrados, pre mezclas, coproductos, granos, granos destilados,
15 melazas, fibras, pastos, hierbas, heno, hojas, harinas, solubles y suplementos.

Tal como es usado aquí mismo, el término "suplemento alimenticio", "suplemento de dieta", "composición de suplemento de dieta" se refiere a un producto formulado
20 como un suplemento nutricional que será usado como parte de una dieta. Composición de suplementos de dieta ejemplares están descrito aquí mismo.

Tal como es usado aquí mismo, el término "animal" se refiere a aquellos que pertenecen al reino animal. Esto
25 incluye, pero no está limitado a, ganado, animales de granja,

animales domésticos, mascotas, animales marinos y de agua dulce y animales salvajes.

Tal como es usado aquí mismo, los términos "administración" y "aplicación" se refiere al acto de dar una
5 sustancia, incluyendo un medicamento, promedicamento, u otro agente, o tratamiento terapéutico a un sujeto. (por ejemplo, un sujeto o células in vivo, in vitro, o ex vivo, tejidos y órganos). Ejemplos de rutas de administración pueden ser a través de los ojos (oftálmico), boca (oral), piel (tópica o
10 transdermal), nariz (nasal), pulmones (inhalante), mucosa oral (bucal), oído, rectal, vaginal, por inyección (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intratumoral, intraperitoneal, etc) y similares.

Tal como es usado aquí mismo, el término "co-
15 administración" se refiere a la administración de por lo menos dos agentes o terapias a un sujeto y/o material (por ejemplo, productos alimenticios). Co-administración de dos o mas agentes o terapias, pueden ser concurrentes, o un agente/terapia puede ser administrado previo a un segundo
20 agente/terapia.

Tal como se usa aquí mismo, el término "tratamiento" se refiere a la medida tomada que facilita el mejoramiento y/o revocación de los síntomas de enfermedad. El término "tratamiento" se refiere a ambos tratamiento
25 terapéutico y profiláctico o medidas preventivas. Por

ejemplo, los temas que se pueden beneficiar con tratamiento con composiciones y métodos de la presente invención incluyen aquellos que ya tienen una enfermedad y/o trastorno así como aquellas enfermedades y/o trastornos que están por ser
5 prevenidos (por ejemplo, usando un tratamiento profiláctico de la presente invención).

Tal como es usado aquí mismo, el término "en riesgo de enfermedad" se refiere a un sujeto que está predispuesto a experimentar una enfermedad en particular. Esta
10 predisposición puede ser genética (por ejemplo, una particular tendencia genética a experimentar enfermedades, tales como desórdenes hereditarios), o debido a otros factores (por ejemplo, edad, peso, condiciones del medio ambiente, exposición a compuestos perjudiciales presentes en
15 el medio ambiente, etc).

Tal como es usado aquí mismo, el término "enfermedad", el término "infección" y el término respuesta o condición patológica" se refiere a un estado, señales y/o síntomas que están asociados con una discapacidad del estado
20 normal del animal vivo o de alguno de sus órganos o tejidos que interrumpen o modifican el rendimiento de las funciones normales, y pueden ser respuesta a factores del medio ambiente (tales como desnutrición, riesgos industriales, o clima, incluyendo micotoxicosis), agentes específicos
25 inefectivos (tales como gusanos, bacterias o virus) a un

defecto inherente del organismo (tales como varias anomalías genéticas), o combinaciones de estos y otros factores.

Tal como es usado aquí mismo, el término "sufriendo de enfermedad" se refiere a un sujeto (por ejemplo un animal
5 o un ser humano) que está experimentando una enfermedad en particular y que no está limitado a algún síntoma o señal en particular o enfermedad.

Tal como es usado aquí mismo, el término "toxico" se refiere a cualquier efecto perjudicial, deletéreo, dañino
10 o de otra manera negativa sobre un sujeto, una célula, o un tejido en comparación con la misma célula o tejido previo al contacto o administrado de la toxina/toxico.

Tal como es usado aquí mismo, el término "composición farmacéutica" se refiere a la combinación de un
15 agente activo con un portador, inerte o activo, haciendo la composición especialmente adecuada para diagnóstico o uso terapéutico in vitro, in vivo o ex vivo.

Tal como es usado aquí mismo, el término "inoculación" se refiere al acto de introducir un micro
20 organismo o suspensión de micro organismos (por ejemplo, algas, levadura, hongos, bacterias, etc) en un medio de cultivo. La inoculación es el acto o proceso de introducir algo en un ambiente en donde crecerá o se reproducirá.

Tal como es usado aquí mismo, el término "inoculo" y el término "pre-inoculo" se refiere a la células usadas en
25

una inoculación, tales como las células agregadas para empezar un cultivo.

Tal como es usado aquí mismo, el término "centrifugación" se refiere a la separación de moléculas por
5 tamaño o densidad usando fuerzas centrífugas generadas por un rotor giratorio que pone a un objeto en rotación alrededor de un eje fijo, aplicando una fuerza perpendicular al eje. La centrífuga funciona usando los principios de sedimentación, donde la aceleración centrípeta es usada para distribuir
10 uniformemente sustancias de mayor y menor densidad en diferentes capas de densidad.

Tal como es usado aquí mismo, el término "concentración" se refiere a la cantidad de una sustancia por espacio definido. Concentración usualmente se expresa en
15 términos de masa por unidad de volumen. Para diluir una solución, uno debe añadir más solvente, o reducir la cantidad de soluto (por ejemplo, por evaporación selectiva, secado por pulverización, secado por congelamiento, por ejemplo, extracto de pared celular de levadura concentrada o extracto
20 de pared celular de levadura modificada concentrada) Por contraste, para concentrar una solución, uno debe agregar más soluto, o reducir la cantidad de solvente.

Tal como es usado aquí mismo, el término "capa" se refiere un depósito organizado en el estado de un material
25 usualmente horizontal formando una parte supra yacente o

segmento obtenido después de la separación por centrifugación en relación con las propiedades de densidad del material.

Tal como es usado aquí mismo, el término "cosecha" se refiere al acto de recoger o poner junto todo el material
5 que ha sido producido (por ejemplo, poner junto todo el material producido durante la producción de levadura).

Tal como es usado aquí mismo, el término "secado" se refiere al secado por pulverización, secado por congelamiento, secado por aire, secado por vacío o cualquier
10 otro tipo de proceso que reduzca o elimine líquido en una sustancia.

Tal como es usado aquí mismo, el término "secado por pulverización" se refiere a un método comúnmente usado de secado de una sustancia que contiene líquido usando gas
15 caliente para evaporar el líquido para reducir o eliminar el líquido en la sustancia. En otras palabras el material se seca mediante atomizando una corriente de aire seco.

Tal como se usa aquí mismo, el término "secado por congelamiento" y el término "liofilización" y el término
20 "criodesecado" se refieren a la eliminación de un solvente de la materia en un estado de congelamiento por sublimación. Esto se logra congelando el material que será secado debajo de su punto eutéctico y después proveer el calor latente de sublimación. El preciso control de la entrada de calor
25 permite secar desde el estado de congelamiento sin derretir

de nuevo el producto. En aplicaciones prácticas, el proceso es acelerado y controlado de manera precisa bajo condiciones reducidas de presión.

Tal como es usado aquí mismo, el término "polvo fluido seco" se refiere a un fluido de polvo seco, por ejemplo un polvo que puede ser vertido de un contenedor, bolsa, buque, etc sin dificultad.

Tal como es usado aquí mismo, el término "molienda" se refiere a la reducción del tamaño de las partículas por impacto, cizallamiento o desgaste.

Tal como es usado aquí mismo, el término "muestra" es usado en un amplio sentido incluyendo un espécimen o un cultivo obtenido de cualquier fuente, así como muestras ambientales o biológicas.

Muestras biológicas pueden ser obtenidas de los animales (incluyendo seres humanos) y abarca líquidos, sólidos, tejidos y gases. Muestras biológicas incluye producto de la sangre, tales como el plasma, suero y similares. Muestras ambientales incluye materiales ambientales tales como materiales de la superficie, suelo, agua, cristales y muestras industriales

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con composiciones que comprenden algas con un alto contenido de

lípidos y métodos para prepararlas y utilizarlas. En particular, la invención se relaciona con biomasa de algas con alto contenido de lípidos y materiales lipídicos algales derivados de la misma, métodos para preparar las mismas, así como combustibles (por ejemplo, biodiesel) y composiciones alimenticias (por ejemplo, alimento para animales) que comprenden o están preparados por el mismo. Las composiciones y métodos de la presente invención encuentran sus uso en una variedad de aplicaciones incluyendo biocombustibles, alimenticias (por ejemplo nutrición humana y animal), terapéuticas así como aplicaciones de investigación.

De acuerdo a esto, en un aspecto de la invención, se proporciona un proceso para la preparación de una biomasa algal que contiene cantidades elevadas (por ejemplo, en una base peso/peso) de la grasa total. Por ejemplos, como se describen aquí, en algunas modalidades, la invención proporciona un método para generar una biomasa algal que contiene un deseado alto nivel de contenido de grasa total (por ejemplo, mayor a 60% de grasa total, en contraste con métodos convencionales que generan biomasa algal que contiene un significativo bajo nivel de contenido total de grasa (por ejemplo, 60% o menos de grasa total)). Un gran reto de biocombustible basado en algal (por ejemplo, biodiesel) es el de asegurar que la biomasa no esté hecha con el costo de mas energía que es obtenida en el producto de combustible final.

De esta manera, en algunas modalidades, la invención proporciona un método para generar una biomasa algal que contiene mayor a 65% de grasa total. En algunas modalidades, la invención proporciona un método para generar una biomasa algal que contiene más de 66% de grasa total. En algunas modalidades, la invención proporciona un método para generar una biomasa algal que contiene más de 67% de grasa total. En algunas modalidades, la invención proporciona un método para generar una biomasa algal que contiene más de 68% de grasa total. En algunas modalidades, la invención proporciona un método para generar una biomasa algal que contiene más de 69% de grasa total. En algunas modalidades, la invención proporciona un método para generar una biomasa algal que contiene más de 70% de grasa total. En algunas modalidades, la invención proporciona un método para generar una biomasa algal que contiene mas de 70% (por ejemplo, mas de 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90% o más) de grasa total en una base p/p. En algunas modalidades, el método utiliza un sistema de bioreactor cerrado (por ejemplo, un fermentador), aunque la invención no está tan limitada (por ejemplo, en algunas modalidades, bioreactores abiertos pueden utilizarse). En una modalidad preferida, el crecimiento de una biomasa algal de la invención se conduce bajo condiciones asépticas. En otra modalidad preferida, las algas crecen (por ejemplo, para

generar una biomasa algal que contiene un contenido alto de grasa (por ejemplo, mayor a 67% de grasa) en un proceso de lote alimentado.

En algunas modalidades, la invención proporciona un
5 método de cultivo de algas para producir una biomasa algal que comprende un deseado alto contenido de grasa total (por ejemplo, 67% o más de grasa total) como se describe en los Ejemplos 1 y 2. Por ejemplo, en algunas modalidades, la invención proporciona un método para cultivar algas que
10 comprenden cultivar el alga en una manera gradual para producir una biomasa algal que comprende un deseado contenido alto de grasa total (por ejemplo, 67% o más de grasa total). En algunas modalidades, el proceso gradual para el cultivo de algas comprende descongelar una cepa de alga almacenada y
15 agregar (por ejemplo, asépticamente) el alga descongelada a un frasco agitador de 1lt que contiene un medio que comprende una fuente de carbono (por ejemplo, azúcar (por ejemplo, glucosa)), extracto de levadura y sal de mar. En algunas modalidades, la fuente de carbono está presente en una
20 concentración de 50 g/L, el extracto de levadura está presente en una concentración de 10vg/L y/o la sal de mar está presente en una concentración de 4 g/L. En algunas modalidades, el frasco agitador de 1 L que contiene algas y un medio se mantiene a 30 °C y agitado (por ejemplo, a
25 aproximadamente 100-400 RPM) hasta que dicho tiempo en el que

el alga ha entrado a una fase de crecimiento exponencial pero que no se ha agotado completamente la fuente de carbono (por ejemplo, azúcar (por ejemplo, glucosa)). Los experimentos realizados durante el desarrollo de las modalidades de la invención han determinado que las algas entran en un crecimiento exponencial pero no se agota totalmente la fuente de carbono (por ejemplo, azúcar (por ejemplo, glucosa)) en un período de tiempo entre 72 y 144 horas a aproximadamente 100 a 400 RPM (por ejemplo, 250 RPM) en un medio que comprende una fuente de carbono (por ejemplo, azúcar (por ejemplo, glucosa)), el extracto de levadura y sal de mar se usa para inocular un cultivo de primera etapa de semilla (por ejemplo, en un recipiente grande (por ejemplo, de 40, 20 o 18 Lt)). En algunas modalidades, el medio de cultivo usado en una primera etapa de semilla comprende una fuente de carbono (por ejemplo, azúcar (por ejemplo, glucosa)), extracto de levadura, sulfato de magnesio, cloruro de calcio y/o cloruro de magnesio. En una modalidad preferida, el medio de cultivo utilizado en una primera etapa de semilla comprende aproximadamente 50 g/L de una fuente de carbono (por ejemplo, azúcar (por ejemplo, glucosa)), aproximadamente 7.5 g/L de extracto de levadura, aproximadamente 0.15 g/L de sulfato de magnesio, aproximadamente 0.15 g/L de cloruro de calcio y/o 0.15 g/L de cloruro de magnesio. En algunas modalidades, el cultivo de primera etapa de semilla se corre a 30°C bajo

condiciones de flujo de aire y agitación para mantener el oxígeno disuelto a aproximadamente 7 a 15% (por ejemplo, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14%), aunque se pueden utilizar condiciones bajas y altas de oxígeno disuelto. En una

5 modalidad preferida, el cultivo de primera etapa de semilla se corre a 30°C bajo condiciones de flujo de aire y agitación para mantener el oxígeno disuelto a aproximadamente 10%. En algunas modalidades, el cultivo de primera etapa de semilla que contiene algas y medio se mantienen a 30°C y se cultivan

10 hasta que dicho tiempo en el que las algas han entrado a la fase de crecimiento exponencial y al menos 20 g/L de fuente de carbono (por ejemplo, azúcar (por ejemplo, glucosa)) ha sido consumido pero la fuente de carbono no ha sido agotada totalmente. Los experimentos realizados durante el desarrollo

15 de las modalidades de la presente invención determinaron que las algas entraron en un crecimiento exponencial, han consumido al menos 20 g/L de la fuente de carbono (por ejemplo, azúcar (por ejemplo, glucosa)) pero no has sido totalmente agotada la fuente de carbono (por ejemplo, azúcar

20 (por ejemplo, glucosa)) en un período de tiempo entre 24 y 48 horas después de la inoculación del cultivo de primera etapa de semilla. En algunas modalidades, las algas cultivadas en un cultivo de primera etapa de semilla a 30 °C por 24 a 48 horas en un medio que comprende una fuente de carbono (por

25 ejemplo, azúcar (por ejemplo, glucosa)), extracto e levadura,

sulfato de magnesio, cloruro de calcio y cloruro de magnesio se usan para inocular un cultivo de segunda etapa de semilla en un recipiente aun mas grande (por ejemplo, de 2000 Lt). En algunas modalidades, el medio de cultivo usado en un cultivo

5 de segunda etapa de semilla comprende una fuente de carbono (por ejemplo, azúcar (por ejemplo, glucosa)), extracto de levadura, sulfato de magnesio, cloruro de calcio y/o cloruro de magnesio. En una modalidad preferida, el medio de cultivo utilizado en un cultivo de segunda etapa de semilla comprende

10 aproximadamente 50 g/L de una fuente de carbono (por ejemplo, azúcar (por ejemplo, glucosa)), aproximadamente 7.5 g/L de extracto e levadura, aproximadamente 0.15 g/L de sulfato de magnesio, aproximadamente 0.15 g/L de cloruro de calcio y/o 0.15 g/L de cloruro de magnesio. En algunas modalidades, el

15 cultivo de segunda etapa de semilla se corre a 30 °C bajo condiciones de flujo de aire y agitación para mantener el oxígeno disuelto a aproximadamente 7 a 15% (por ejemplo, 8,9,10,11,12,13,14%), aunque se pueden utilizar condiciones altas y bajas de oxígeno disuelto. En una modalidad

20 preferida, el cultivo de segunda etapa de semilla corre a 30 °C bajo condiciones de flujo de aire y agitación para mantener el oxígeno disuelto a aproximadamente 10%. En algunas modalidades, el cultivo de segunda etapa de semilla que contiene algas y medio se mantiene a 30 °C y se cultiva

25 hasta el tiempo en que las algas han entrado a la fase de

crecimiento exponencial, y al menos 20 g/L de fuente de carbono (por ejemplo, azúcar (por ejemplo, glucos)) ha sido consumida, pero la fuente de carbono no ha sido totalmente agotada. Los experimentos realizados durante el desarrollo de las modalidades de la presente invención determinaron que las algas entran en el crecimiento exponencial, consume al menos 20 g/L de la fuente de carbono (por ejemplo, azúcar (por ejemplo, glucosa)) pero no se agota totalmente la fuente de carbono (por ejemplo, azúcar (por ejemplo, glucosa) en un período de tiempo entre 24 a 48 horas después de la inoculación del cultivo de segunda etapa de semilla. En algunas modalidades, las algas cultivadas en el cultivo de segunda etapa de semilla a 30 °C por 24 a 48 horas en un medio que comprende una fuente de carbono (por ejemplo, azúcar (por ejemplo, glucosa)), extracto de levadura, sulfato de magnesio, cloruro de calcio y cloruro de magnesio, se usan para inocular un recipiente de gran escala (por ejemplo, 70,000 Lt, 120,000 Lt, 220,000 Lt o recipientes mas grandes, por ejemplo, un fermentador principal)) que contiene medio usado para un cultivo/fermentación adicional de las algas. En algunas modalidades, cuando se transfiere el cultivo de segunda etapa de semilla al recipiente de gran escala (por ejemplo, fermentador principal), el medio de cultivo (por ejemplo, el medio en lote) presente en un recipiente de gran escala (por ejemplo, el fermentador principal) comprende una

fuelle de carbono (por ejemplo, azúcar (por ejemplo, glucosa)), extracto de levadura, sulfato de magnesio, urea, cloruro de calcio, cloruro de magnesio y/o fosfato de monopotasio. En una modalidad preferida, el medio de cultivo
5 usado en un cultivo de gran escala (por ejemplo, 70,000 Lt, 120,000 Lt, 220,000 Lt o un recipiente mas grande (por ejemplo, un fermentador principal)) comprende aproximadamente 50 g/L de una fuente de carbono (por ejemplo, azúcar (por ejemplo, glucosa)), aproximadamente 7.5 g/L de extracto de
10 levadura, aproximadamente 4.0 g/L de sulfato de magnesio, aproximadamente 1 g/L de urea, aproximadamente 2 g/L de cloruro de calcio, aproximadamente 2 g/L de cloruro de magnesio y/o 0.25 g/L de fosfato de monopotasio. En algunas modalidades, el cultivo de gran escala corre a 30 °C bajo
15 condiciones de flujo de aire y agitación para mantener el oxígeno disuelto a aproximadamente 7 a 15% (por ejemplo, 8,9,10,11,12,13,14%), aunque se pueden utilizar condiciones altas y bajas de oxígeno disuelto. En una modalidad preferida, el cultivo de gran escala corre a 30 °C bajo
20 condiciones de flujo de aire y agitación para mantener el oxígeno disuelto a aproximadamente 10%. En una modalidad preferida, la fuente de carbono (por ejemplo, azúcar (por ejemplo glucosa)) se mantiene a 10 g/L por un período de tiempo (por ejemplo, 1 o más días (por ejemplo,
25 2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14 o más días (por ejemplo,

utilizando un proceso de lote alimentado)). Por ejemplo, en algunas modalidades, después de que se ha consumido una cantidad deseable de glucosa, por algas en el recipiente de gran escala (por ejemplo, después de aproximadamente 20 a 30 g/L de glucosa ha sido consumida por las algas en un recipiente de gran escala (por ejemplo, después de que 30 g/L de la glucosa se ha consumido)), las alimentaciones de glucosa y de lote alimentado han comenzado. Los experimentos conducidos durante el desarrollo de las modalidades de la invención determinaron que las alimentaciones de lote alimentado se agreguen por aproximadamente 34 horas, aunque se pueden usar períodos de tiempo más cortos (por ejemplo, aproximadamente 32, 28, 24, 20 horas o menos) y más largos (por ejemplo, 36, 38, 42, 46, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144, 156, 168 horas o mas). En modalidades preferidas adicionales, cuando se completa el proceso de lote alimentado, el cultivo de algas se continúa en los recipientes de gran escala hasta que todos los nutrientes se remueven/consumen del medio. Los experimentos realizados durante el desarrollo de las modalidades de la invención determinaron que los nutrientes se agotan del medio entre aproximadamente 12 y 24 horas después de que cesó el proceso de lote alimentado. En algunas modalidades, la biomasa algal se cosecha del medio/caldo de cultivo de gran escala y se utiliza como se describe en la presente. En algunas

modalidades, el caldo de cultivo de gran escala se centrifuga para obtener la biomasa algal. En algunas modalidades, el caldo de cultivo a gran escala se enfría antes de la centrifugación. Aunque no es necesario un entendimiento del mecanismo para llevar a cabo la invención, y la invención no está limitada a un mecanismo de acción particular, en algunas modalidades, el enfriar el caldo de cultivo aumenta la densidad de la biomasa algal que comprende niveles elevados de la grasa total (por ejemplo, lípidos/aceite) y permite una recuperación más grande de la biomasa que el que se alcanza en ausencia del enfriamiento del caldo de cultivo (ver, por ejemplo, Ejemplo 3). La invención no está limitada por la temperatura a la cual el cultivo de larga escala se enfría antes de la configuración. En algunas modalidades, el cultivo de gran escala se enfría a temperatura entre 0 y 50 °C, entre 5 a 40 °C, 5 a 25 °C, 5 a 15 °C ó 5 a 10 °C.

De esta manera, la presente invención utiliza tanto el modo de lote como el modo de lote alimentado para el cultivo de algas (por ejemplo, solo y/o subsecuente a una primera y/o segunda etapa de semilla) con el fin de generar una biomasa algal que contiene un contenido de grasa deseado (por ejemplo, un contenido de grasa mayor a 67%). La invención no está limitada por los componentes individuales presentes en el medio usados ya sea en los modos de lote o lote alimentado. En algunas modalidades, el medio de cultivo

presenta, en el tiempo de inoculación del fermentador principal (por ejemplo, en un recipiente de 70,000 Lt, 120,000 Lt, 220,000 Lt) que contiene medio con una proporción inicial de nitrógeno (N): fósforo (P): potasio (K) de 46:13:8.5. En una modalidad preferida, la proporción de cloruro (Cl_2): sulfato (SO_4) es de 1:1 en medio de cultivo usado tanto en el modo de lote como en el modo de lote alimentado. En algunas modalidades, la proporción de sulfato (SO_4):fosfato (PO_4) en el medio en el tiempo de inoculación de un fermentador principal (por ejemplo, un recipiente de 70,000 Lt, 120,000 Lt, 220,000 Lt) es de 16:1. En algunas modalidades, la proporción total de sulfato (SO_4): fosfato (PO_4) que ha sido loteado y alimentado al final de un cultivo completo (por ejemplo, incluyendo inóculo, primera etapa de semilla, segunda etapa de semilla y cultivos de fermentador principal) que genera una biomasa algal que comprende un contenido de grasa deseado (por ejemplo, mayor a 67% de grasa) es 5.3:1. En algunas modalidades, la proporción de cloruro (Cl_2): fosfato (PO_4) en el medio en el tiempo de inoculación de un fermentador principal (por ejemplo, un recipiente de 70,000 Lt, 20,000 Lt, 220,000 Lt) es 16:1. En algunas modalidades la proporción total de cloruro (Cl_2): fosfato (PO_4) que ha sido loteado y alimentado al final de un cultivo completo (por ejemplo, incluyendo inóculo, primera etapa de semilla, segunda etapa de semilla y cultivos de

fermentadores principales) que generan una biomasa algal que contienen un contenido de grasa deseado (por ejemplo, mayor a 67% de grasa) es 5.3:1.

Como se describe en el Ejemplo 2 abajo, la presente
5 invención también proporciona una composición que comprende una biomasa algal (por ejemplo, una biomasa algal seca (por ejemplo, generada de acuerdo al método descrito en la presente invención)) que contiene una cantidad deseada del total de grasa y/u otros componentes. Por ejemplo, en algunas
10 modalidades, la presente invención proporciona una biomasa algal (por ejemplo, una biomasa seca) que contiene un contenido total de grasa mayor a 67% (por ejemplo, mayor a 68% de grasa total, mayor a 69% de grasa total, mayor a 70% de grasa total, mayor a 71% de grasa total, mayor a 72% de
15 grasa total, mayor a 73% de grasa total, mayor a 74% de grasa total, mayor a 75% de grasa total, mayor a 76% de grasa total, mayor a 77% de grasa total, mayor a 78% de grasa total o una cantidad mayor de grasa total). En algunas modalidades, la biomasa algal (por ejemplo, que tienen más del 67% de
20 grasa total) se seca de tal manera que la biomasa contiene menos del 5% de humedad (por ejemplo, menos del 4.5% de humedad, menos del 4% de humedad, menos del 3.5% de humedad, menos del 3% de humedad, menos del 2.5% de humedad, menos del 2% de humedad, o menos del 1.5% de humedad). En algunas
25 modalidades, una biomasa algal de la invención (por ejemplo,

biomasa seca, contiene menos del 5% de humedad) contiene aproximadamente de 170 a 250 mg/g o más de ácido docosaheptaeónico (DHA) (por ejemplo, aproximadamente 170-180 mg/g DHA, aproximadamente 180-190 mg/g DHA, aproximadamente 5 190-200 mg/g DHA, aproximadamente 200-210 mg/g DHA, aproximadamente 210-220 mg/g DHA, aproximadamente 220-230 mg/g DHA, aproximadamente 230-240 mg/g DHA, aproximadamente 240-250 mg/g DHA, o más de 250 mg/g DHA). En algunas modalidades la biomasa algal de la invención (por ejemplo, 10 una biomasa seca que contiene menos de 5% de humedad) contiene aproximadamente 150-400 mg/g o más de ácido palmítico (nombre IUPAC: ácido hexadecanoico (por ejemplo, aproximadamente 150-200 mg/g, aproximadamente 200-225 mg/g, aproximadamente 225-250 mg/g, aproximadamente 250-275 mg/g, 15 aproximadamente 275-300 mg/g, aproximadamente 300-325 mg/g, aproximadamente 325-350 mg/g, aproximadamente 375-400 mg/g, o más de 400 mg/g)). En algunas modalidades, la biomasa algal de la invención (por ejemplo, una biomasa seca que tienen menos de 5% de humedad) contiene aproximadamente de 300-600 20 mg/g o más de ácidos grasos totales (por ejemplo, aproximadamente 300-350 mg/g, aproximadamente 350-400 mg/g, aproximadamente 400-450, aproximadamente 450-500 mg/g, aproximadamente 500-550 mg/g, aproximadamente 550-600 mg/g, o más de 600 mg/g de ácidos grasos)). En algunas modalidades la 25 biomasa algal de la invención (por ejemplo, una biomasa seca

que contiene menos de 5% de humedad) contiene menos de aproximadamente 15% de proteína (por ejemplo, menos de aproximadamente 14% de proteína, menos de aproximadamente 13% de proteína, menos de aproximadamente 12% de proteína, menos de aproximadamente 11% de proteína, menos de aproximadamente 10% de proteína, menos de aproximadamente 9% de proteína, o menos de aproximadamente 8% de proteína).

La presente invención no está limitada por la cepa o especies de algas utilizadas en los métodos y composiciones descritas en la presente. De hecho, una variedad de algas encuentran su uso en la invención, incluyendo, pero no estando limitado a, una o mas especies de género *Thraustochytrium*. En algunas modalidades, el alga es una especie del género *Chlorella*. En algunas modalidades, el alga es una especie del género *Schizochytrium*. En algunas modalidades, el alga es una especie del género *Crypthecodinium*. En algunas modalidades, el alga es *Thraustochytrium striatum*, *Thraustochytrium roseum*, *Thraustochytrium aureum*, *Crypthecodinium cohnii*, y/o *Aurantiochytrium sp.* En una modalidad preferida, *Schizochytrium limacinum* se utiliza en los métodos y composiciones descritos en la presente invención. La invención no está limitada por el tipo de lípidos producidos por un proceso para generar una biomasa algal con niveles elevados de lípidos descritos en la presente. En algunas

modalidades, los lípidos generados por un proceso de la invención incluyen, pero no están limitados a, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido oleico, ácido linoléico, ácido docosapentaenoico (DPA), ácido docosahexaenóico (DHA),
5 y ácido esteárico. Estos lípidos han sido útiles para tanto la salud animal como la salud humana, para la prevención de varias enfermedades tales como enfermedades cardiovasculares e inflamatorias y en la nutrición infantil para un desarrollo próspero del cerebro y una visión retinal en
10 niños.

En otra modalidad, la invención proporciona un proceso para la producción de una biomasa algal que contiene niveles elevados (por ejemplo, mayores a 67%) de la grasa total de una especie de alga (por ejemplo, *Schizochytrium*
15 *limacinum*), en donde el proceso comprende cultivar algas en un primer recipiente de alimentación por lote que comprende medio (por ejemplo, comprendiendo aproximadamente 50 g/Lt de una fuente de carbono (por ejemplo, azúcar (por ejemplo, glucosa)), aproximadamente 7.5 g/Lt de extracto de levadura,
20 aproximadamente 0.15 g/Lt de sulfato de magnesio, aproximadamente 0.15 g/Lt de cloruro de calcio y/o 0.15 g/Lt de cloruro de magnesio), transfiriendo (por ejemplo, asépticamente) el primero cultivo de alimentación por lote a un segundo medio de cultivo de lote de semilla (por ejemplo,
25 comprendiendo aproximadamente 50 g/Lt de una fuente de

carbono (por ejemplo, azúcar (por ejemplo, glucosa)),
aproximadamente 7.5 g/Lt de extracto de levadura,
aproximadamente 0.15 g/Lt de sulfato de magnesio,
aproximadamente 0.15 g/Lt de cloruro de calcio y/o 0.15 g/Lt
5 de cloruro de magnesio), transfiriendo (por ejemplo,
asépticamente) el segundo cultivo de lote de semilla a un
recipiente de cultivo de gran escala que contiene medio (por
ejemplo, un fermentador principal (por ejemplo, en un
recipiente de 70,000 Lt, 120,000 Lt, 220,000 Lt, que contiene
10 por ejemplo, medio que comprende aproximadamente 50 g/Lt de
una fuente de carbono (por ejemplo, azúcar (por ejemplo,
glucosa)), aproximadamente 7.5 g/Lt de extracto de levadura,
aproximadamente 4.0 g/Lt de sulfato de magnesio,
aproximadamente 1 g/L de urea, aproximadamente 2 g/Lt de
15 cloruro de calcio, aproximadamente 2 g/Lt de cloruro de
magnesio y/o aproximadamente 0.25 g/Lt de fosfato de
monopotasio) en donde el nivel de glucosa del recipiente de
cultivo a gran escala se mantiene a 10 g/Lt usando un proceso
de lote alimentado, en donde las células algales se cultivan
20 del cultivo de gran escala entre 12-24 horas después de que
cesa el proceso de lote alimentado después de que todos los
nutrientes han sido removidos/consumidos del medio.

Otra modalidad de la invención proporciona un
proceso para producir una biomasa algal que contiene niveles
25 elevados (por ejemplo, mayores a 67%) de grasa total de una

especia de alga (por ejemplo, *Schizochytrium limacinum*), en donde el medio de cultivo (por ejemplo, durante cada etapa de fermentación (por ejemplo, una primera etapa de semilla, una segunda etapa de semilla y/o un cultivo por lotes (lote alimentado) etapa de cultivo)) que comprende una fuente de carbono (por ejemplo, un azúcar), extracto de levadura, una fuente de fosfato (por ejemplo, fosfato de monopotasio, sulfato de magnesio y/o sulfato de zinc), una fuente de nitrógeno (por ejemplo, urea), cloruro de magnesio, y/o cloruro de calcio. En una modalidad preferida, la invención proporciona un proceso para producir una biomasa algal que contiene niveles elevados (por ejemplo, mayores a 67%) de grasa total de una cepa de un alga en donde el medio de cultivo (por ejemplo, durante cada etapa de fermentación (por ejemplo, la primera etapa de semilla, la segunda etapa de semilla y/o cultivo por lotes (lote alimentado) etapa de cultivo)) comprende azúcar, extracto de levadura, fosfato de monopotasio, sulfato de magnesio, sulfato de zinc), urea, cloruro de magnesio, y/o cloruro de calcio. Sin embargo, la invención no está limitada por el tipo de nutriente utilizado en un medio de cultivo en el cual el alga crece. En algunas modalidades, una o más fuentes de carbono son adicionadas al medio. Ejemplos de fuentes de carbono incluyen, pero no están limitadas a, carbohidratos tales como glucosa, fructosa, xilosa, sacarosa, maltosa o almidones solubles así como ácido

oleico, grasas tales como aceite de soya, melaza, glicerol, manitol y acetato de sodio, harina de semilla de algodón, glicerol, melaza y licor de maíz escarpado. En algunas modalidades, una o más fuentes de nitrógeno se adicionan al medio. Ejemplos de fuentes de nitrógeno incluyen, pero no están limitadas a, fuentes de nitrógeno natural como peptona, extracto de levadura, extracto de malta, extracto de carne, ácido casamino y licor de maíz escarpado, fuentes de nitrógeno orgánico tales como glutamato de sodio y urea, o fuentes de nitrógeno inorgánico tales como acetato de amonio, sulfato de amonio, cloruro de amonio, nitrato de amonio y sulfato de amonio. En algunas modalidades, una o más fuentes de fosfato se adicionan al medio. Ejemplos de fuentes de fosfato incluyen, pero no están limitadas a fosfato de potasio, fosfato dihidrogenado de potasio, sales inorgánicas, tales como sulfato de amonio, sulfato de sodio, sulfato de magnesio, sulfato de hierro, sulfato de zinc, y sulfato de cobre. En algunas modalidades, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, y/o vitaminas se incluyen en el medio de cultivo.

La invención no está limitada por la cantidad (por ejemplo, concentración) de cada uno de estos componentes en el medio de cultivo. En algunas modalidades, se utiliza una cantidad que no es dañina para el crecimiento algal. En una modalidad preferida, la cantidad (por ejemplo, concentración y/o proporción) de cada ingrediente del medio, se establece a

un nivel (por ejemplo, durante cada etapa de fermentación (por ejemplo, primera etapa de semilla, segunda etapa de semilla y/o etapa de cultivación de cultivo de lote (lote alimentado) que promueve la formación de alto contenido de
5 grasa de alga (por ejemplo, una biomasa algal que comprende 67% o mayor de contenido de grasa). En algunas modalidades, la fuente de carbono (por ejemplo, azúcar) está presente en el medio de cultivo a aproximadamente 20 a 120 gramos por litro de medio. En otras modalidades, la fuente carbono (por
10 ejemplo, azúcar) está presente en el medio de cultivo a aproximadamente 30 a 70 gramos por litro de medio. En aún otras modalidades, la fuente de carbono (por ejemplo, azúcar) está presente en el medio de cultivo a aproximadamente 40 a 60 gramos por litro de medio. En una modalidad preferida, la
15 fuente de carbono (por ejemplo, azúcar) está presente en el medio de cultivo a aproximadamente 50 gramos por litro de medio). En alguna modalidades, la proporción de urea a fosfato monopotásico (urea:KH₂PO₄) está entre aproximadamente 5:0.1 (por ejemplo, aproximadamente 4.5:0.1; 4:0.25; 3:0.25;
20 4:0.3; 5:0.5; 4:0.5; 3:0.5; 2:0.5; ó 1:0.5); aunque se pueden usar proporciones más altas o más bajas (por ejemplo, 1:1, 1:2, 1:3, etc.). En una modalidad preferida, la proporción de urea a fosfato monopotásico en el medio de cultivo es 4:1. En algunas modalidades, un medio de cultivo no contiene cloruro
25 de sodio. En otras modalidades, el medio de cultivo contiene

cloruro de sodio. En algunas modalidades, la proporción de sulfato de magnesio (MgSO_4): cloruro de calcio (CaCl_2) es 1:1. En algunas modalidades, la proporción de sulfato de magnesio (MgSO_4): cloruro de calcio (CaCl_2) es 1:2. De hecho, una variedad de proporciones de sulfato de magnesio (MgSO_4):cloruro de calcio (CaCl_2) pueden usarse, incluyendo, pero no estando limitado a 1:1; 1:1.125; 1:1.5; 1:1.75; 1:2, 1:2.125; 1:2.25; 1:2.5; 2.5:1; 2.25:1; 2.125:1; 2:1; 1.75:1; 1.5:1; 1.25:1 ó 1.125:1. En una modalidad preferida, la proporción de sulfato de magnesio (MgSO_4):cloruro de calcio (CaCl_2) en un primer medio de cultivo de semilla es 1:1. En otra modalidad preferida, la proporción de sulfato de magnesio (MgSO_4): cloruro de calcio (CaCl_2) en un segundo medio de cultivo de semilla es 1:1. En aun otra modalidad preferida, la proporción de sulfato de magnesio (MgSO_4): cloruro de calcio (CaCl_2) en un medio de cultivo a gran escala (por ejemplo, un fermentador principal (por ejemplo, un recipiente de 70,000 Lt, 120,000 Lt, 220,000 Lt) también referidos en la presente como un tercer medio de cultivo) es 1:2.

En una modalidad preferida adicional, después de preparar el medio, el pH del medio no necesita ajustarse. Por ejemplo, durante un proceso de fermentación paso por paso de la invención, el pH del medio de cultivo en el cual crece el alga no necesita ajustarse. Aunque no es necesario un

entendimiento del mecanismo, para practicar la invención y la invención no está limitada a un mecanismo de acción particular, en algunas modalidades, condiciones estériles o asépticas del proceso de fermentación paso por paso de la invención niega la necesidad de ajustar el pH del medio de cultivo durante la fermentación. En algunas modalidades, el pH del medio de cultivo está entre 4.0 y 6.5. El cultivo de algas durante el proceso de fermentación paso por paso de la invención puede llevarse a cabo a una temperatura entre 10 y 40 °C, preferentemente 17 a 35 °C, y más preferentemente alrededor de 30 °C. El cultivo puede llevarse a cabo por cultivo aireación-agitación, cultivo agitado, cultivo estacionario o similares. En una modalidad preferida, las algas se cultivan bajo condiciones tales que el oxígeno disuelto se mantiene a o ligeramente arriba del 10%.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un suplemento alimenticio, alimentario, nutricional o terapéutico que comprende todas o una porción de biomasa algal (por ejemplo, biomasa algal seca descrita en la presente y/o generada de acuerdo a los métodos y composiciones descritas en la presente) que comprenden niveles elevados (por ejemplo, mayores a 67%) de grasa total. Por ejemplo, en algunas modalidades, la invención proporciona un suplemento alimenticio, alimentario, nutricional o terapéutico que comprende una biomasa algal secada por

aspersión que comprende niveles elevados (por ejemplo, mayores a 67%) de grasa total. En otras modalidades, la invención proporciona un suplemento alimenticio, alimentario, nutricional o terapéutico que comprende lípidos extraídos y/o
5 aislados de una biomasa algal que comprende niveles elevados (por ejemplo, mayores a 67%) de la grasa total. La invención no está limitada por el tipo lípido extraído y/o aislado de la biomasa algal que comprende niveles elevados (por ejemplo, mayores a 67%) de grasa total. En algunas modalidades, los
10 lípidos comprenden ácido mirístico, ácido palmítico, ácido oleico, ácido linoléico, ácido alfa-linolénico (ALA), ácido estearidónico (SDA), ácido eicosatrienóico, ácido eicoesatetraenóico, ácido eicosapentaenóico (EPA), ácido docosapentaenóico (DPA), ácido elupanodónico, ácido
15 docosaheptaenóico (DHA), ácido tetracosapentaenóico, y/o ácido tetracosahexaenóico. En una modalidad preferida, los lípidos comprenden DHA y/o ácido palmítico.

En algunas modalidades, la invención proporciona un proceso para la preparación de lípidos (por ejemplo, aquellos
20 descritos en la presente (por ejemplo, ácido docosaheptaenóico)) que comprenden: cultivar una cepa de alga (por ejemplo, *Schizochytrium limacinum*) en un primer medio de cultivo (por ejemplo, conteniendo 50 g/Lt de una fuente carbono (por ejemplo, azúcar (por ejemplo, glucosa)), 10 g/Lt
25 de extracto de levadura y 4 g/Lt de sal de mar) e incubar el

cultivo a una temperatura en el rango de 25 a 35 °C por un periodo de aproximadamente 72 a 144 horas; transferir el cultivo a un segundo medio de cultivo (por ejemplo, conteniendo 50 g/Lt de una fuente de carbono (por ejemplo, azúcar (por ejemplo, glucosa)), aproximadamente 7.5 g/Lt de extracto de levadura, aproximadamente 0.15 g/Lt de sulfato de magnesio, aproximadamente 0.15 g/Lt de cloruro de calcio y/o 0.15 g/Lt de cloruro de magnesio) e incubar el cultivo a una temperatura en el rango de 25 a 35 °C por un periodo de aproximadamente 24 a 48 horas; transferir el cultivo a un tercer medio de cultivo (por ejemplo, conteniendo 50 g/Lt de una fuente de carbono (por ejemplo, azúcar (por ejemplo, glucosa)), aproximadamente 7.5 g/Lt de extracto de levadura, aproximadamente 0.15 g/Lt de sulfato de magnesio, aproximadamente 0.15 g/Lt de cloruro de calcio y/o 0.15 g/Lt de cloruro de magnesio) e incubar el cultivo a una temperatura en un rango de 25 a 35 °C por un periodo de 24 a 48 horas; transferir el cultivo a un cuarto medio de cultivo (por ejemplo, conteniendo 50 g/Lt de una fuente de carbono (por ejemplo, azúcar (por ejemplo, glucosa)), aproximadamente 7.5 g/Lt de extracto de levadura, aproximadamente 4.0 g/Lt de sulfato de magnesio, aproximadamente 1 g/Lt de urea, aproximadamente 2 g/Lt de cloruro de calcio, aproximadamente 2 g/Lt de cloruro de magnesio y/o aproximadamente 0.25 g/Lt de fosfato de monopotasio) e incubar el cultivo a una

temperatura en el rango de 25 a 35 °C (por ejemplo, 30 °C) por un periodo de tiempo de aproximadamente 24 a 192 horas (por ejemplo, aproximadamente 36, aproximadamente 38, aproximadamente 42, aproximadamente 46, aproximadamente 60, aproximadamente 72, aproximadamente 84, aproximadamente 96, aproximadamente 108, aproximadamente 120, aproximadamente 132, aproximadamente 144, aproximadamente 156, aproximadamente 168, aproximadamente 180, aproximadamente 192 horas); separar la biomasa de célula del cultivo; y extraer los lípidos de la biomasa.

En algunas modalidades, los cultivos de algas (por ejemplo, crecidos para producir una biomasa algal) son crecidos en recipientes y volúmenes apropiados, que van en el rango de 100 ml hasta cientos de miles de litros, en vasos o fermentadores grandes, usando varios medios de nutrientes como se describen en la presente.

En aun otro aspecto, la separación de biomasa de células que contienen lípidos se obtiene usando centrifugación, filtración y/o floculación o técnicas similares. En una modalidad preferida, una biomasa algal se obtiene a partir de un cultivo usando centrifugación. En aun otra modalidad preferida, la centrifugación ocurre después de que el cultivo celular es enfriado (por ejemplo, para permitir la recuperación de las células que contienen niveles elevados de lípido). En algunas modalidades, una biomasa

algal que se obtiene, se seca por aspersión y es usada (por ejemplo, directamente usada en el alimento para animal o para producción de biocombustible).

En una modalidad, el alga es una mezcla de
5 diferentes especies de algas (por ejemplo, una o más de las especies de alga descritas en la presente). En algunas modalidades, se una biomasa algal contiene niveles elevados de grasa total y/o lípidos extraídos de una biomasa algal que contiene niveles elevados de grasa total (por ejemplo, ácidos
10 grasos poliinsaturados) a partir de otras fuentes que incluyen, pero no están limitadas a fuentes de plantas.

En algunas modalidades, la biomasa algal contiene niveles elevados de grasa total que comprende lípidos en una concentración de (peso/peso) en un rango de aproximadamente
15 60 a 90% (por ejemplo, aproximadamente 65 a 90%, aproximadamente 66 a 89%, aproximadamente 67 a 88%, aproximadamente 68 a 87%, aproximadamente 68 a 86%, aproximadamente 69 a 85%, o aproximadamente 70 a 80%). De esta manera, una biomasa algal que contiene niveles elevados
20 de lípidos puede comprender niveles a una concentración de 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90% y similares. En otra modalidad, una biomasa algal que contiene niveles elevados de grasa
25 total comprende lípidos a una concentración de al menos 67%.

En algunas modalidades, el DHA está incluido en una composición de biomasa algal de la invención en un rango de 1% a 75% de lípidos/ácidos grasos totales. De esta manera, el DHA puede ser provisto en la composición en una cantidad de

5 ácidos grasos de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%,

10 aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, y similares. En otras modalidades, el DHA puede incluirse en una composición en una cantidad de ácidos grasos totales en el rango de 1% a 5%, 1% a 10%, 1% a 15%, 1% a 20%, 1% a 25%, 1% a 30%, 5% a 10%, 5% a 15%, 5% a 20%, 5% a 25%,

15 5% a 30%, 10% a 15%, 10% a 20%, 10% a 25%, 10% a 30%, 15% a 20%, 15% a 25%, 15% a 30%, 20% a 25%, 20% a 30%, 25% a 30%, 30% a 35%, 35% a 40%, 40% a 45%, 45% a 50%, 50% a 55%, 55% a 60%, 60% a 65%, 65% a 70%, 70% a 75%, y similares.

En algunas modalidades, el ácido palmítico está

20 incluido en una composición de biomasa algal de la invención en un rango de 1% a 75% de lípidos/ácidos grasos totales. De esta manera, el ácido palmítico puede proporcionarse en la composición en una cantidad de ácidos grasos totales de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%,

25 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%,

28%, 29%, 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%,
aproximadamente 45%, aproximadamente 50%, aproximadamente
55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%,
aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, y similares. En
5 otras modalidades, el ácido palmítico puede incluir una
composición en una cantidad de ácidos grasos totales en el
rango de 1% a 5%, 1% a 10%, 1% a 15%, 1% a 20%, 1% a 25%, 1%
a 30%, 5% a 10%, 5% a 15%, 5% a 20%, 5% a 25%, 5% a 30%, 10%
a 15%, 10% a 20%, 10% a 25%, 10% a 30%, 15% a 20%, 15% a 25%,
10 15% a 30%, 20% a 25%, 20% a 30%, 25% a 30%, 30% a 35%, 35% a
40%, 40% a 45%, 45% a 50%, 50% a 55%, 55% a 60%, 60% a 65%,
65% a 70%, 70% a 75%, y similares.

Modalidades adicionales de la invención incluyen
procesos para hacer aditivos para alimento para animales. De
15 esta manera, en una aspecto de la presente invención es un
proceso para hacer aditivos para alimento para animales que
comprende lípidos de una alga (por ejemplo, biomasa algal),
el proceso comprende: cultivar algas para producir una
biomasa algal que contiene un nivel elevado deseado de grasa
20 total (por ejemplo, mayor a 67% de grasa total); y extraer
lípidos de alga a partir de una biomasa de algas para producir
un aceite de alga; y/o remover agua de una biomasa de alga
para producir una biomasa de alga con un contenido de sólidos
de aproximadamente 5% a 100% en porcentaje de peso; en donde
25 el aditivo para alimento para animal comprende lípidos de

algas. En algunas modalidades, los ácidos grasos recolectados a partir del alga son de cadena corta, mediana o cadena larga omega-3 de ácidos grasos. En aun otra modalidad, el lípido de alga extraído de la biomasa de alga es combinado con una
5 biomasa de alga con un contenido de sólidos de aproximadamente 5% a 100% en porcentaje de eso.

Un aditivo de alimento de conformidad con la presente invención puede ser combinado con otros componentes de alimento para producir alimento procesado o producto
10 alimenticios (por ejemplo productos alimenticios para animales y/o humanos). Tales otros componentes de alimentos incluyen uno o más suplementos enzimáticos, aditivos de alimentos vitamínicos y aditivos de alimentos minerales. El aditivo para alimentos resultantes (combinado) puede ser
15 mezclado en una cantidad apropiada con otros componentes alimenticios tales como cereal y proteínas de plantas para formar un producto alimenticio procesado. El procesamiento de estos componentes en un producto alimenticio procesado puede realizarse usando cualquier equipo de procesamiento
20 convencional. Los aditivos alimenticios/alimentarios de la presente invención puede usarse como un suplemento en un alimento/alimentación por si mismo, adicionalmente con vitaminas, minerales, otras enzimas alimenticias, co-productos agrícolas (por ejemplo, acemitas de trigo o
25 meriendas de gluten de maíz), o combinaciones de los mismos.

En aun otro aspecto, la invención proporciona un proceso para producir un animal y/o humano que tiene contenido de tejido aumentado de ácidos grasos omega-3, el proceso comprende alimentar a un animal/humano un aditivo alimenticio que comprende lípidos/ácidos grasos recolectados de algas, el aditivo alimenticio además comprende: (a) un extracto de lípido de alga de una biomasa de alga cultivada y/o (b) una biomasa de alga de una alga cultivada, en donde el agua es removida de una biomasa de alga para alcanzar el contenido de sólidos de aproximadamente 5 a 100% en por ciento de peso, en donde el animal/humano muestra un contenido de tejido aumentado de ácidos grasos omega-3. La invención no está limitada a un mamífero particular (por ejemplo, animal o humano) que puede beneficiarse a partir de una composición de la invención. De hecho, los animales de la invención incluyen, pero no están limitados a, cualquier animal que produce huevos, carne, leche u otros productos que son consumidos por humanos u otros animales. De esta manera, los animales de la presente invención incluyen, pero no están limitados a pescado, aves (pollos, pavos, patos, etc.), cerdos, borregos, cabras, conejos, carne de res y ganado lechero.

En algunas modalidades, la invención proporciona un método para tratar una enfermedad de mamífero en un sujeto en necesidad del mismo mediante la administración a dicho sujeto

de una cantidad terapéuticamente efectiva una composición de la invención. En algunas modalidades, la enfermedad de mamífero que es tratada incluye, pero no está limitada a, una enfermedad cardiovascular, una enfermedad inflamatoria, y
5 varias enfermedades de cáncer. En otras modalidades, las enfermedades cardiovasculares a ser tratadas, incluyen, pero no están limitadas a, hipertrigliceridemia, enfermedad coronaria del corazón, ataque al corazón, infarto agudo al miocardio y aterosclerosis. En modalidades adicionales, las
10 enfermedades inflamatorias a ser tratadas incluyen, pero no están limitadas a, asma, artritis, rinitis alérgica, psoriasis, dermatitis atópica, enfermedades inflamatorias del intestino, enfermedad de Crohn, y rinoconjuntivitis alérgica. En aun modalidades adicionales, las enfermedades de cáncer a
15 ser tratadas incluyen, pero no están limitadas a, cáncer de próstata, cáncer de mama y cáncer de colon. En modalidades adicionales, las enfermedades de mamíferos a ser tratadas incluyen enfermedades psiquiátricas, las enfermedades psiquiátricas incluyen, pero no están limitadas a, depresión,
20 desorden bipolar, esquizofrenia. Adicionalmente, las composiciones de la invención pueden usarse para mantener y/o mejorar funciones cognitivas.

En algunas modalidades, la invención proporciona un método para tratar una enfermedad de mamífero en un sujeto en
25 necesidad del mismo mediante la administración al sujeto de

una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición de
lípidos proporcionada por y/u obtenida de una biomasa algal
conteniendo un nivel elevado de grasa total (por ejemplo,
mayor a 67% de grasa total). Los sujetos que pueden obtener
5 un beneficio del tratamiento incluyen pero no están limitados
a, sujetos aviarios y mamíferos. Los mamíferos de la
presente invención incluyen pero no están limitados a,
caninos, felinos, bovinos, caprinos, equinos, ovinos,
porcinos, roedores (por ejemplo, ratas y ratones),
10 lagomorfos, primates (incluyendo primates no humanos),
humanos y similares, y mamíferos in útero. Cualquier sujeto
mamífero en necesidad de ser tratados de acuerdo a la presente
invención puede ser apropiado. Los mamíferos de la presente
invención incluyen, pero no están limitados a, caninos,
15 felinos, bovinos, caprinos, equinos, ovinos, porcinos,
roedores (por ejemplo, ratas y ratones), lagomorfos,
primates (incluyendo primates no humanos), humanos y
similares, y mamíferos in útero. De acuerdo con algunas
modalidades de la presente invención, los mamíferos son
20 mamíferos no humanos. En algunas modalidades, el mamífero es
un sujeto humano. Los mamíferos sujetos de ambos géneros y en
cualquier etapa de desarrollo (por ejemplo, neonato,
infantes, juveniles, adolescentes, adultos) pueden ser
tratados de acuerdo a la presente invención. Aves
25 ilustrativas de acuerdo con la presente invención incluyen

pero no están limitados a pollos, patos, pavos, gansos, codornices, faisanes, ratites (por ejemplo, avestruz), aves domesticadas (por ejemplo, pericos y canarios), y aves in-ovo.

5

Algas

Un alga capaz de producir, utilizando el proceso descrito en la presente, niveles elevados de grasa total o biomasa algal conteniendo niveles elevados de grasa total puede usarse en los procesos, composiciones, suplementos alimenticios, biocombustible y/o precursor de biocombustible y/o aditivos alimenticios de la invención. De esta manera, en algunas modalidades, las algas de la presente invención se seleccionan de *Thraustochytrium*, *Dinophyceae*, *Cryptophyceae*, *Trebouxiohyceae*, *Pnguiophyceae*, y combinaciones de estos. En otras modalidades, las algas de la presente invención se seleccionan de *Traustochytrium striatum*, *Thraustochytrium roseum*, *Thraustochytrium aureum*, *Crypthecodinium cohnii*, *Parietochloris* spp., *Rhodomonas* spp., *Cryptomonas* spp., *Parietochloris* spp., *Hemisebuis* spp., *Porphyridium* spp., *Glossomastix* spp., y combinaciones de los mismos. En modalidades adicionales, las algas de la invención se seleccionan de *Parietochloris incise*, *Rhodomonas salina*, *Hemiselmis brunescens*, *Porphyridium cruentum* y *Glossomastix chrysoplasta*, y combinaciones de los mismos. En aun otra

25

modalidad, las algas de la invención son *Schyzochytrium limacinum*.

En algunas modalidades de la invención, las algas son una mezcla de diferentes especies de algas. En otras
5 modalidades, el alga es una especie única de alga. En algunas modalidades de la presente invención, los lípidos/ácidos grasos de algas se proporcionan como una aceite algal. En otras modalidades, los lípidos/ácidos grasos de algas se proporcionan como una biomasa algal (por ejemplo, una biomasa
10 seca (por ejemplo, en polvo)).

Aun más, las algas de la presente invención incluyen, pero no están limitadas a, algas genéticamente ingenieriles o mutantes (naturalmente o inducidas) de tipo salvaje. En una modalidad preferida, las algas usadas en los
15 proceso, composiciones, suplementos alimenticios, biocombustibles o precursores de biocombustibles y/o aditivos alimenticios de la invención son organismos no genéticamente modificados. Como se usan en la presente invención, los términos "variante genéticamente modificada" y "organismo
20 genéticamente modificado" se refieren a una cepa de alga que tiene un genoma que ha sido modificado (por ejemplo, mutado, cambiado) de su forma normal (por ejemplo, de tipo salvaje, que ocurre naturalmente) de tal manera que un resultado deseado se alcanza.

25 Adicionalmente, las algas de la invención incluyen

algas que tienen células con paredes celulares de un grosor reducido comparado con las células de algas de tipo salvaje, en donde la pared celular de grosor reducido mejora la extracción y/o biodisponibilidad de la fracción de lípidos de las algas (por ejemplo, mejora la facilidad de digestión de las algas y la facilidad de extracción de los lípidos/ácidos grasos de las algas de las células de la biomasa algal). Las algas que tienen células con paredes celulares de grosor reducida comparadas con las células de algas de tipo salvaje pueden ocurrir naturalmente, mutadas y/o genéticamente ingenieriles para tener paredes celulares de grosor reducido comparado con las cepas de tipo salvaje. De esta manera, en una modalidad de la invención las algas son algas que tienen paredes celulares de grosor reducido comparado con algas de tipo salvaje, en donde la pared celular de grosor reducida mejora la extracción y/o biodisponibilidad de la fracción de lípidos de algas. Los métodos para producir algas con paredes celulares reducidas incluyen aquellos encontrados en WO 2006/107736 A1, incorporada por referencia de manera completa, en la presente. De esta manera, las algas pueden mutarse con mutágenos conocidos por aquellos expertos en el arte incluyendo, pero no estando limitados a, agentes químicos o radiación. En modalidades particulares, los mutágenos químicos incluyen, pero no están limitados a, etil metanosulfonato (EMS), sulfonato de metilmetano (MMS), N-etil-

N-nitosourea (ENU), trietilmelamina (TEM), N-metil-N-nitrosourea (MNU), procarbacin, clorambucil, ciclofosfamida, dietil sulfato, monómero de acrilamida, melfalano, mostaza de nitrógeno, vincristina, 2-aminopurina, 7,12 dimetil-
5 benz(a)antracena (DMBA), óxido de etileno, hexametilfoforamida, bisulfano, diepoxialcanos (diepoxioctano (DEO), diepoxibutano (BEB), y similares), 2-metoxi-6-cloro-9(3-(etil-2-clor-o-etipaminopropilamino)acridina dihidrocloruro (ICR-170), formaldehído, y similares. Métodos
10 de mutagénesis de radiación incluyen, pero no están limitados a rayos x, radiación gama, luz ultravioleta, y similares.

Los mutágenos de las paredes celulares pueden seleccionarse para, en la base de sensibilidad incrementada a detergentes o por medio de observación microscópica de
15 alteraciones en el grosor de la pared celular (ver por ejemplo, WO 2006/107736 A1) o cualquier otro método conocido en el arte para detectar la reducción del grosor de la pared celular o la integridad reducida de la pared celular.

Las algas de la invención pueden cultivarse de
20 acuerdo con las técnicas aquí descritas en los Ejemplos 1 a 3.

De acuerdo a esto, en algunas modalidades, las algas se cultivan a una temperatura en el rango de 10°C a 35°C. De esta manera, las algas pueden cultivarse a una
25 temperatura de 10°C, 11°C, 12°C, 13°C, 14°C, 15°C, 16°C, 17°C,

18°C, 19°C, 20°C, 21°C, 22°C, 23°C, 24°C, 25°C, 26°C, 27°C, 28°C, 29°C, 30°C, 31°C, 32°C, 33°C, 34°C, y similares. En otras modalidades, las algas pueden crecer en los rangos de 20°C a 35°C, aunque se pueden utilizar más fríos (por ejemplo, menos
5 de 20°C) y más cálidos (por ejemplo, más de 35°C). En una modalidad preferida, las algas crecen a aproximadamente 30°C.

En algunas modalidades, que siguen al cultivo, las algas se cosechan. En algunas modalidades, la cosecha de algas se lleva a cabo usando procedimientos convencionales
10 conocidos por aquellos expertos en el arte, incluyendo, pero no estando limitados a, centrifugación, floculación o filtración. En una modalidad preferida, antes de la cosecha, el cultivo de algas se enfría, de esta manera permitiendo a las células de algas que contienen niveles elevados de grasa
15 total, a ser cosechada de manera exitosa. Las células de algas cosechadas o biomasa algas pueden entonces ser usadas directamente como una fuente de lípidos/ácidos grasos o extraídos para obtener aceite algal que comprende lípidos/ácidos grasos. En algunas modalidades en las cuales
20 la biomasa algas se utiliza directamente, agua se remueve de la biomasa algal para alcanzar el contenido de sólidos de aproximadamente 5 a 100 por ciento en peso. En modalidades adicionales, una biomasa algal que se usa directamente está comprendida de células algales que comprende además paredes
25 celulares que son al menos parcialmente disruptivas para

aumentar la extracción y/o biodisponibilidad del aceite algal dentro de las células. La disrupción de las células algales puede llevarse a cabo de acuerdo con técnicas conocidas que incluyen, pero no están limitadas a, tratar las células con
 5 agua hervida o por medio de rompimiento mecánico tal como, trituración, pulverización, sonicación, prensa Francesa, o cualquier otro método conocido por una persona experta en la materia.

Cuando la biomasa algal se usa directamente, se
 10 remueve el agua de la biomasa algal para alcanzar el contenido de sólidos de aproximadamente 5 a 100%. De acuerdo a esto, en algunas modalidades, el agua se remueve de la biomasa algal para alcanzar el contenido de sólidos de aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%,
 15 50%, 55%, 60%, 65%, 66%, 67%, 67%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, y similares. En modalidades adicionales, el agua se remueve de la biomasa algal para alcanzar el
 20 contenido de sólidos en el rango de aproximadamente 5% a 50%, 5% a 60%, 5% a 70%, 5% a 80%, 5% a 90%, 5% a 95%, 10% a 30%, 10% a 40%, 10% a 50%, 10% a 60%, 10% a 65%, 10% a 70%, 10% a 75%, 10% a 80%, 10% a 85%, 10% a 90%, 10% a 95%, 10% a 100%, 15% a 40%, 15% a 50%, 15% a 60%, 15% a 65%, 15% a 70%, 15% a
 25 75%, 15% a 80%, 15% a 85%, 15% a 90%, 15% a 95%, 15% a 100%,

20% a 50%, 20% a 60%, 20% a 65%, 20% a 70%, 20% a 75%, 20% a 80%, 20% a 85%, 20% a 90%, 20% a 95%, 20% a 100%, 25% a 50%, 25% a 60%, 25% a 70%, 25% a 75%, 25% a 80%, 25% a 85%, 25% a 90%, 25% a 95%, 25% a 100%, 30% a 50%, 30% a 60%, 30% a 70%, 30% a 75%, 30% a 80%, 30% a 85%, 30% a 90%, 30% a 95%, 45% a 100%, 50% a 70%, 50% a 75%, 50% a 80%, 50% a 85%, 50% a 90%, 50% a 95%, 50% a 100%, 55% a 75%, 55% a 80%, 55% a 85%, 55% a 90%, 55% a 95%, 55% a 100%, 60% a 75%, 60% a 80%, 60% a 85%, 60% a 90%, 60% a 95%, 60% a 100%, 70% a 80%, 70% a 85%, 70% a 90%, 70% a 95%, 70% a 100%, 75% a 85%, 75% a 90%, 75% a 95%, 75% a 100%, 80% a 85%, 80% a 90%, 80% a 95%, 80% a 100%, 85% a 90%, 85% a 95%, 85% a 100%, 90% a 95%, 95% a 100% y similares.

En algunas modalidades, las células de algas de la biomasa son disruptivas o lisadas y los lípidos de algas extraídos. Las células de algas pueden extraerse en húmedo o seco de acuerdo con técnicas convencionales para producir una composición que contienen lípidos/ácidos grasos. La disrupción o lisis de las células algales pueden llevarse a cabo de acuerdo con técnicas convencionales incluyendo, pero no estando limitado a, tratar las células con agua hervida o por rompimiento mecánico tal como molienda, pulverización, sonciación, prensa Francesa, o cualquier otro método conocido. La extracción de lípidos/ácidos grasos a partir de células lisadas sigue procedimientos estándar usados con

algal y otros organismos que son conocidos incluyendo, pero no estando limitado a, separar la fase líquida de la fase sólida siguiendo de lisis de la célula, extraer los lípidos/ácidos grasos en la fase líquida por la adición de un
5 solvente, evaporar el solvente, y recuperar los lípidos/ácidos grasos obtenidos de la fase líquida de las células lisadas.

La invención no está limitada a un solvente en particular usado para la extracción. Los solventes incluyen,
10 pero no están limitados a, hexano, cloroformo, etanol, metanol, isopropanol, dietil éter, dioxano, isopropil éter, diclorometano, tetrahidrofurano, éter de petróleo y combinaciones de los mismos.

En algunas modalidades, los lípidos/ácidos grasos
15 derivados de una biomasa algal de la invención se proporcionan en la forma de ácidos grasos libres, ésteres de colesterol, ésteres de sal, ésteres de ácidos grasos, monogliceridos, diglicéridos, triglicéridos, diacilgliceroles, monogliceroles, esfingofosfolípidos,
20 esfingoglicolípidos, o cualquier combinación de los mismos (por ejemplo, para su uso en procesos, composiciones, biocombustibles, productos alimenticios, suplementos alimenticios, aditivos alimentarios u otras composiciones descritas en la presente).

Método para preparar una biomasa algal

En algunas modalidades, la invención proporciona un método para preparar una biomasa algal que comprende niveles elevados de grasa total (por ejemplo, mayor a 67% de lípidos), que comprenden: cultivar algas bajo una condición de cultivo suficiente para proporcionar una biomasa algal que comprende niveles elevados de grasa total (por ejemplo, mayor a 67% de lípidos), en donde la biomasa algal se cosecha en la terminación de una fase de crecimiento logarítmico de algas (ver por ejemplo, los Ejemplos 1 y 2). Como se usa en la presente, el término "fase de crecimiento logarítmico", se refiere a una etapa del cultivo caracterizada por aumentar exponencialmente el número de células de alga. Generalmente, en un sistema de cultivo, existe un patrón de crecimiento característico seguido por la inoculación que incluye una fase lag, una fase exponencial o "fase de crecimiento logarítmico", una fase de aceleración de crecimiento negativa, y una meseta o "fase estacionaria". Por ejemplo, en la fase de crecimiento logarítmico, como crecimiento de las algas continua, las células pueden alcanzar su máxima velocidad de división celular y números de incremento de células en relación log al tiempo. Dentro del tiempo después del comienzo de la fase log, la velocidad de división celular puede comenzar a declinar y algunas de las células pueden comenzar a morir. Esto se ve reflejado en una curva de

crecimiento por un aplanamiento gradual fuera de la línea. Eventualmente, la velocidad de la muerte de células es esencialmente igual a la velocidad de la división celular, y la población viable total puede permanecer la misma por un
5 período de tiempo. Esto es conocido como la fase estacionaria o de meseta y está representada en la curva de crecimiento como un aplanamiento fuera de la línea en donde la inclinación se acerca a cero. En una modalidad preferida, la biomasa algal se cultiva bajo condiciones asépticas (por
10 ejemplo, para prevenir la contaminación y/o el crecimiento de los microorganismos contaminadores (por ejemplo, levadura, bacterias, virus, etc.) en el cultivo).

En algunas modalidades, la condición del cultivo es suficiente para las algas para producir niveles elevados de
15 grasa total (por ejemplo, mayor a 67% en una base peso/peso). Las condiciones del cultivo comprenden un medio de cultivo apropiado para crecer las algas, de tal manera proporcionando la biomasa de algas que comprenden niveles elevados de grasa total (por ejemplo, mayor a 67% en una base peso/peso). Los
20 medios de cultivo apropiados se describen en la presente. El medio puede también comprender sales, vitaminas, minerales, metales y otros nutrientes. Preferentemente, la condición de cultivo es suficiente para proporcionar una cantidad apropiada de nutriente y temperatura para las algas para
25 crecer bajo condiciones que generan una biomasa algal que

comprenden niveles elevados de grasa total.

En algunas modalidades, el cultivo comprende limitar un nutriente (por ejemplo, nitrógeno, fósforo) para un tiempo adecuado para incrementar la cantidad total de grasas. Por ejemplo, el cultivo puede carecer de un cierto nutriente o ser transferido a un medio de cultivo separado que carece de un nutriente específico (por ejemplo, medio libre de fósforo o libre de nitrógeno, o un medio de cultivo que contiene niveles bajos de un nutriente). En algunas modalidades, el medio de cultivo contiene un contenido inicial de un nutriente tal que el nutriente se agota en un tiempo posterior durante el crecimiento exponencial pero anterior al agotamiento de otros nutrientes. En algunas modalidades, el cultivo no comprende limitar un nutriente (por ejemplo, nitrógeno, fósforo) durante el cultivo. En algunas modalidades, el cultivo de una sola biomasa algal se realiza en dos o más tipos de medio en una manera secuencial. En algunas modalidades, el cultivo de una sola biomasa algal tiene lugar en tres ó más tipos de medio en una manera secuencial. De manera similar, el cultivo de una sola biomasa algal puede tener lugar en dos o más recipientes, en donde un primer recipiente es usado para inocular un recipiente subsecuente, el recipiente subsecuente se usa para inocular otro recipiente subsecuente, y así. Aunque se entiende que un mecanismo no es necesario para llevar a la práctica la

invención, y la invención no está limitada a un mecanismo de acción particular, en algunas modalidades, el cultivo secuencial de una única biomasa algal en múltiples recipientes conteniendo múltiples tipos de medio, permite que
5 la biomasa algal crezca a partir de una biomasa algal (por ejemplo, de la misma especie algal) crecida en un solo recipiente y/o medio de crecimiento.

El cultivo de algas puede realizarse en una bioreactor convencional adecuado para cultivar las algas para
10 proporcionar una biomasa de algas. Por ejemplo, las algas pueden cultivarse por un proceso que incluye, pero no está limitado a, lotes, lote de alimentación, reciclaje de células y fermentación continua. En una modalidad preferida, las algas se cultivan en un proceso de lote alimentado.

15 La invención no está limitada a una manera particular o método para cosechar las algas a partir de medio de cultivo. Una variedad de métodos pueden usarse para cosechar las células de algas a partir del medio de cultivo. En otra modalidad, la cosecha comprende la recuperación de
20 biomasa algal a partir del medio de cultivo mediante la separación, por ejemplo por filtración (por ejemplo, filtración de banda, filtración de tambor rotatorio) y/o centrifugación. Si se desea, las células algales cosechadas pueden entonces lavarse, congelarse, liofilizarse, secarse
25 por aspersión, y/o almacenarse bajo una atmósfera no oxidante

de un gas (por ejemplo, CO₂, N₂) para reducir o eliminar la presencia de O₂. Opcionalmente, antioxidantes sintéticos y/o naturales, incluyendo, pero no estando limitados a, hidroxitolueno butilado (BHT), hidroxianisol butilado (BHA),
5 terbutilhidroquinona (TBHQ), etoxiquina, beta caroteno, vitamina E y vitamina C, también pueden agregarse a las células cosechadas.

En algunas modalidades, la invención proporciona un método para preparar una biomasa algal que comprende niveles
10 elevados de grasa total, el método comprende: cultivar algas bajo una condición de cultivo suficiente para proporcionar una biomasa algal que comprende niveles elevados de grasa total y cosechar la biomasa algal.

15 Biomasa de microalga

La invención proporciona, en algunas modalidades, una biomasa algal y/o una fracción y/o un extracto del mismo (por ejemplo, para uso en la producción de un biocombustible y/o como un producto alimenticio o alimentario).

20 En algunas modalidades, la biomasa algal comprende un contenido de ácido graso omega 3 de al menos 10% de peso seco de la biomasa, ilustrativamente, aproximadamente 10% a aproximadamente 50%, aproximadamente 10% a aproximadamente 40%, aproximadamente 10% a aproximadamente 30%
25 aproximadamente 10% a aproximadamente 20% de peso seco de la

biomasa. En una modalidad, la biomasa algal se prepara de acuerdo con los métodos de la invención. Por ejemplo, en algunas modalidades, la biomasa algal se prepara por un método que comprende: cultivar un alga bajo una condición de
5 cultivo suficiente para proporcionar una biomasa algal que comprende niveles elevados de grasa total (por ejemplo, mayor a 67% peso/peso), en donde la biomasa algal se cosecha en una fase de crecimiento acelerado negativo o una fase estacionaria. En otra modalidad, la biomasa algal se cosecha
10 del cultivo durante la fase de crecimiento logarítmica exponencial.

Composiciones de lípidos preparadas a partir de biomasa algal

15 En algunas modalidades, la invención proporciona un método para preparar un extracto de lípidos/ácidos grasos (por ejemplo, una composición de lípidos/ácidos grasos) de una biomasa algal crecida bajo condiciones que contienen niveles elevados de grasa total, el método comprende obtener
20 lípidos de una biomasa algal cultivada bajo una condición de cultivo suficiente para proporcionar una biomasa algal con un contenido elevado de grasa total (por ejemplo, contenido de grasa total mayor a 67% de la biomasa), en donde la biomasa algal se cosecha en una fase de crecimiento acelerado
25 negativa o una fase estacionaria del alga. En otra modalidad,

la biomasa algal se cosecha durante una fase de crecimiento logarítmico del alga.

Los métodos par obtener una composición de lípidos de una biomasa algal de la invención, incluyen, pero no están
5 limitados a, extracción, calentamiento, presión, saponificación, sonicación, congelación, molienda, intercambio de iones, cromatografía, separación de membrana, electrodiálisis, ósmosis inversa, destilación, derivatización química, cristalización, etc. Por ejemplo, los lípidos
10 algales pueden extraerse de las células algales por cualquier método apropiado incluyendo, pero no estando limitado a, extracción con un solvente incluyendo, pero no estando limitado a, etanol, acetato de etilo, alcohol isopropílico, u otros (con o sin cosolventes), o a través de extracción de
15 fluido supercrítico (con o sin cosolventes). Opcionalmente, el aceite extraído de lípidos/ácidos grasos se evaporan bajo una presión reducida para reducir o remover el solvente y/o producir una muestra de material de lípidos concentrado. En otras modalidades, las células se rompen o lisan para obtener
20 la composición de lípidos, por ejemplo en una forma de aceite (por ejemplo, para su uso como un biocombustible o un precursor de biocombustible). En algunas modalidades, los aceites extraídos son sujetos a refinación. La invención no está limitada por el tipo de refinación. En algunas
25 modalidades, los aceites extraídos son químicamente

refinados. En algunas modalidades, los aceites extraídos son físicamente refinados. En algunas modalidades, los aceites extraídos son refinados tanto químicamente como físicamente. Los aceites extraídos (por ejemplo, de una biomasa algal
5 crecida bajo condiciones para elevar el contenido total de grasas de la célula algal (por ejemplo, por arriba de 67%)) puede refinarse usando cualquier método convencional de refinación. El proceso de refinación puede remover algunas o todas las impurezas de los lípidos/ácidos grasos/aceites. En
10 algunas modalidades, el proceso de refinación comprende uno más pasos para quitar la goma, decolorar, filtrar, deodorizar y/o pulir los lípidos/ácidos grasos/aceites extraídos.

En algunas modalidades, los lípidos/ácidos grasos/aceites contenidos en la composición de lípidos
15 extraída es concentrada por hidrólisis de los lípidos para concentrar la fracción de lípidos mediante el empleo de un método tal como, por ejemplo, aducción de urea, destilación fraccionada, cromatografía de columna, y/o fraccionamiento de fluido supercrítico.

20 De acuerdo a esto, en una modalidad, la etapa de obtener una composición de lípidos de una biomasa algal de la invención comprende extraer la composición de lípidos de una biomasa. En otra modalidad, la etapa de obtener una composición de lípidos de una biomasa algal de la invención
25 comprende contactar la biomasa con una solvente polar.

Por ejemplo, en algunas modalidades, los lípidos/ácidos grasos/aceites se extraen de la biomasa algal para proporcionar una composición de lípidos usando un solvente bajo una condición de extracción suficiente para
5 extraer lípidos y/o ácidos grasos pero no es suficiente para extraer compuestos que son insolubles en el solvente. En una modalidad, una composición de lípidos/ácidos grasos es extraída a partir de una biomasa algal de la invención, en donde los compuestos de desechos celulares y/o precipitados
10 insolubles se separan de la fracción que contiene lípidos/ácidos grasos y solvente. En otra modalidad, el método además comprende separar el desecho celular y los compuestos precipitados usando un método de separación tal como filtración, centrifugación y/o combinaciones de los
15 mismos. En algunas modalidades, el desecho celular y/o compuestos insolubles precipitados (por ejemplo, esa porción de la biomasa algal que no son solubles en un solvente (por ejemplo, proteínas, fibras, etc) son recuperadas y utilizadas (por ejemplo, en un producto alimenticio o alimentario).

20 En algunas modalidades, el solvente es un solvente polar. Ejemplos de solventes polares incluyen, pero no están limitados a, etanol, acetato de etilo, alcohol isopropílico, metanol, acetato de etilo, y mezclas de los mismo. En una modalidad, el solvente polar es etanol. La extracción de la
25 composición de lípidos con una solvente puede llevarse a cabo

de varias maneras. Por ejemplo, la extracción puede ser un proceso en lotes, un proceso continuo, o un proceso en contracorriente. En un proceso continuo en contra corriente, el contacto de solvente con la microalga, filtra el aceite en el solvente, proporcionando una fracción incrementalmente más solvente-aceite. Seguida de la extracción, el solvente puede removerse usando métodos conocidos en el arte. Por ejemplo, destilación, evaporación rotativa, o un evaporador vertical de tubos largos y destilación al vapor o cualquier desolventizador apropiado puede usarse para remover el solvente.

En una modalidad, los lípidos/ácidos grasos extraídos se exponen a un proceso de absorción (por ejemplo, blanqueado) para remover uno o más compuestos indeseables tales como, por ejemplo, cuerpos de color y/o fosfatos que puedan estar presentes. En algunas modalidades, el proceso de absorción es un proceso de blanqueamiento que comprende contactar el extracto de lípidos/ácidos grasos con una material blanqueador (por ejemplo, tierra neutral (por ejemplo, barro natural o tierra fuller), tierra activada con ácido, carbón activado, arcillas activadas, silicatos, y o una combinación de los mismos). La invención no está limitada por la cantidad de material blanqueador utilizado.

En una modalidad, los lípidos/ácidos grasos extraídos se exponen a una etapa de quitar la goma. Los

métodos para quitar la goma son conocidos en el arte e incluyen, por ejemplo, quitar la goma del agua, de ácido, enzimática, y de membrana. En algunas modalidades, el extracto de lípidos/ácidos grasos se sujetó a quitar la goma

5 (por ejemplo, seguido de un proceso de absorción), en donde el quitar la goma comprende contactar el extracto de lípidos/ácidos grasos con una mezcla de ácidos acuosos que están en una cantidad efectiva para precipitar gomas y/o compuestos de tipo de clorofila que pueden estar presentes en

10 el extracto de la composición de lípidos/ácidos grasos. La invención no está limitada por el tipo o cantidad de ácidos acuosos utilizados. En una modalidad, la mezcla de ácidos acuosos comprende ácido sulfúrico y/o ácido fosfórico. En otra modalidad, cantidades iguales de ácidos acuosos se

15 mezclan con la composición de lípidos. En una modalidad preferida, cuando se mezcla con el aceite, los ácidos acuosos están en una cantidad suficiente para proporcionar un pH ácido. Precipitados que se forman después de la mezcla ácida pueden removerse de la composición de lípidos, por ejemplo

20 usando centrifugación y/o filtración (por ejemplo, filtración de membrana). En algunas modalidades, la composición de extracto de lípidos/ácidos grasos sin la como se someten a secado (por ejemplo, para reducir el contenido de humedad de la composición). La invención no está limitada por la

25 condición de secado (por ejemplo, tiempo, temperatura y/o uan

condición de vacío). Como se describe en la presente, en algunas modalidades, el contenido de humedad de la composición de lípidos/ácidos grasos secos es menor que aproximadamente 10% peso/peso (por ejemplo menor a
 5 aproximadamente 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1, 0.05 ó 0.01% peso/peso).

Composición de lípidos

En algunas
 10 modalidades, la invención proporciona una composición de lípidos preparada a partir de una biomasa algal de la invención. En algunas modalidades, la composición de lípidos es preparada de acuerdo con un método de la invención. Por ejemplo, en algunas modalidades, una composición de lípidos
 15 es una biomasa algal o una porción/fracción del mismo de algas del género *Thraustochyrium*. En algunas modalidades, la biomasa algal comprende un alga seleccionada de *Dinophyceae*, *Cryptophyceae*, *Trebouxiophyceae*, *Pinguiophyceae*, y/o combinaciones de los mismos. En otras modalidades, la biomasa
 20 algal comprende un alga seleccionada de *Thraustochytrium striatum*, *Thraustochytrium roseum*, *Thraustochytrium aureum*, *Cryptothecodinium cohnii*, *Parietochloris* spp., *Rhodomonas* spp., *Cryptomonas* spp., *Parietochloris* spp., *Hemisebneris* spp., *Porphyridium* spp., *Glossomastix* spp., y/o combinaciones de
 25 los mismos. En una modalidad adicional, la biomasa algal

comprende un alga seleccionada de *Parietochloris incise*,
Rhodomonas salina, *Hemiselmis brunescens*, *Porphyridium*
cruentum y *Glossomastix chrysoplata*, y combinaciones de los
 mismos. En una modalidad preferida, la biomasa algal
 5 comprende *Schizochytrium limacinum*.

Productos alimenticios y aditivos de alimento para animal.

En algunas modalidades, una biomasa algal de célula
 10 completa, fracción y/o extracto del mismo s usa para consumo
 (por ejemplo, por un mamífero (por ejemplo, para consumo
 humano o animal)) o como un aditivo para alimento (por
 ejemplo, para aumentar el contenido de lípidos y/o
 componentes nutricionales de un alimento). Por ejemplo, en
 15 algunas modalidades, cuando se usa como alimento para
 animales (por ejemplo, alimento para ganado, alimentos
 lácteos, alimento para acuicultura, alimento para aves de
 corral, etc), los lípidos/ácidos grasos producidos por una
 biomasa algal de la invención se incorpora dentro de un
 20 producto alimenticio (por ejemplo, alimento para animal). En
 algunas modalidades, una biomasa algal de célula completa,
 fracción y/o extracto de la misma, se usa para propósitos
 farmacéuticos o nutricionales y/o aplicaciones industriales.

La biomasa algal de célula completa, fracción y/o
 25 extracto de la misma puede proporcionars en cualquiera de una

variedad de formas/composiciones apropiadas para una aplicación particular o uso. En algunas modalidades, la biomasa algal de célula completa, fracción, y/o extracto de la misma es provista. En otra modalidad, la biomasa algal de célula completa, fracción y/o extracto de la misma se proporciona en forma de polvo o como un aceite libre en una forma líquida (por ejemplo, composición de lípidos o una fracción de concentración de la misma). Una biomasa algal de célula completa, fracción, y/o extracto de la misma puede usarse para consumo humano y/o animal. Por ejemplo, en algunas modalidades, una biomasa algal de célula completa, fracción y/o extracto de la misma se proporciona como o incorporada dentro de un alimento, un suplemento alimenticio, una comida, una formulación farmacéutica, un producto lácteo, y/o una fórmula para infantes.

Por ejemplo, en una modalidad, una biomasa algal de célula completa, fracción y/o extracto de la misma es secada (por ejemplo, secada por aspersión, secada en túnel, secada por vacío) y usada como suplemento alimenticio o alimentario para cualquier animal u organismo de la acuicultura (por ejemplo, pescado, camarón, cangrejo, langosta, etc.) cuya carne y/o productos se consumen por humanos o animales (por ejemplo, mascotas, ganado). En otra modalidad, una biomasa algal de célula completa, fracción y/o extracto de la misma se mezcla con un agente seco reductor de humedad (por

ejemplo, grano molido tal como molido de maíz).

La composiciones descritas en la presente pueden usarse como un producto alimenticio completo, como un componente de un producto alimenticio, como un suplemento
5 alimenticio o como parte de un suplemento dietético, como un aditivo alimenticio y puede ser tanto líquido, como semisólido o sólido. Las composiciones de la invención adicionalmente pueden estar en la forma de una composición farmacéutica. Las composiciones, suplemento dietéticos,
10 productos alimenticios, productos de comida para bebé, aditivos alimenticios y/o composiciones farmacéuticas de la invención puede utilizarse en métodos para promocionar la saluda de un individuo. Las composiciones pueden estar en forma líquida, semisólida o sólida. Por ejemplo, las
15 composiciones puede administrarse como tabletas, paquetes de gel, cápsulas, cápsulas de gelatina, bebidas saborizadas, como un polvo que puede reconstituirse en dicha bebida, aceite para cocinar, aceite para ensalada o aderezo, salsa, jarabe, mayonesa, margarina o similares. Aun más, el producto
20 alimenticio, suplementos dietéticos y similares de la presente invención pueden incluir, pero no están limitados a, productos lácteos, comida para bebé, fórmula para bebé, bebidas, barras, polvos, coberturas para alimento, bebidas, cereales, helados, dulces, mezclas de botanas, un producto
25 alimenticio cocinado y productos alimenticios fritos. Las

bebidas de la invención incluyen pero no están limitadas a bebidas energéticas, bebidas nutracéuticas, batidos, bebidas deportivas, jugo de naranja y otras bebidas de fruta. Una barra de la presente invención incluye, pero no está limitada a, una barra para reemplazar una comida, una barra nutricional, una barra de botana y una barra energética, una barra extruida y similares. Los productos lácteos de la invención incluyen, pero no están limitados a, yogurt, bebidas de yogurt, quesos y leche. Las composiciones pretendidas para administración oral pueden prepararse de acuerdo con cualquier método conocido para la manufactura de suplementos dietéticos o preparaciones farmacéuticas, y tales composiciones pueden incluir al menos un aditivo seleccionado del grupo que consiste de sustancias mejoradoras del sabor, tales como agentes endulzantes o agentes saborizantes, estabilizadores, emulsionadores, agentes colorantes y agentes conservadores con el fin de proporcionar una preparación dietéticamente o farmacéuticamente palatable. Las vitaminas, minerales y elementos traza de una fuente fisiológicamente aceptable también puede incluirse en la composición de la invención.

En algunas modalidades, una composición farmacéutica de la invención comprende las composiciones de la invención en una cantidad terapéuticamente efectiva. Las composiciones de la invención pueden formularse para su

administración de acuerdo con técnicas de farmacia conocidas. Ver, por ejemplo, Remington, The Science And Practice of Pharmacy (9th Ed. 1995). En la manufactura de una composición farmacéutica de acuerdo a la invención, las composiciones de
5 lípidos (incluyen las sales fisiológicamente aceptables de la misma) se mezclan típicamente con, entre otras cosas, un portador aceptable. El portador puede ser compatible con cualquiera otros ingredientes en la formulación y no debe de ser dañino para los sujetos.

10

Biocombustible

Muchas de las tecnologías existentes para hacer biocombustibles a partir de algas, son caros, ineficientes y no sostenibles cuando se operan a una escala que se requiere
15 para desplazar cualquier fracción significativa de petrodiesel en el mercado. El suministro y gasto de energía para cosechar y procesar algas son muchas veces subestimadas. Para producir biodiesel de algas, convencionalmente, las algas se cosechan típicamente de un cultivo a una
20 concentración de aproximadamente 0.2 g/Lt en agua. Las algas cosechadas son entonces deshidratadas, lo cual aumenta la concentración algal para formar una pasta de algas de aproximadamente 15% de sólidos. La pasta es entonces secada completamente por evaporación de agua. El aceite es entonces
25 extraído del alga seca con un solvente orgánico, tal como

hexano, el cual se remueve por destilación del aceite algal. Este método convencional para generar biodiesel a partir de algas es prohibitivamente caro.

Por ejemplo, cuando el alga crece en un cuerpo de
5 agua natural, la biomasa algal es relativamente diluida considerando el volumen de agua. Producir un galón de aceite requiere procesar aproximadamente 20,000 a 40,000 de galones de agua. El costo de energía de transportación y procesamiento de un volumen tan grande agua, es alto. Como un
10 ejemplo, 2,500 galones de aceite/acre/año pueden producirse si el alga con 25% de su masa como lípidos puede producirse a 25 g/m.sum.2/día. Para este ejemplo, 50 millones de galones de agua deben de procesarse para producir 2,500 galones de aceite. El acercamiento estándar de bombear agua a un
15 edificio centralizado para deshidratar es simplemente muy intenso energéticamente y prohibitivo en costo. Como un ejemplo, un edificio relativamente pequeño de aceite algal que produce 20 millones de galones/año gastará más energía bombeando agua del lago al edificio central que la contenida
20 en el producto de aceite, resultando en un balance de energía neto negativo.

De acuerdo a esto, en algunas modalidades, la invención proporciona un método para preparar una biomasa algal y/o extracto de lípidos/ácidos grasos (por ejemplo, una
25 composición de lípidos/ácidos grasos) a partir de una biomasa

algal, crecida bajo condiciones para contener niveles elevados de grasa total, el método comprende obtener lípidos a partir de una biomasa algal cultivada bajo una condición de cultivo suficiente para proporcionar una biomasa algal con un
5 contenido total de grasa elevado (por ejemplo, un contenido total de grasa mayor a 67% de la biomasa), en donde la biomasa algal se cosecha en una fase de crecimiento acelerado negativo o en una fase estacionaria del alga. En otra modalidad, la biomasa algal se cosecha durante la fase de
10 crecimiento logarítmico del alga. Los métodos para obtener una composición de lípidos a partir de una biomasa algal de la invención se describe en la presente invención.

De acuerdo a esto, en algunas modalidades, la invención proporciona una alimentación de biocombustible o un
15 biocombustible que comprende lípidos, hidrocarburos o ambos, derivados de un cultivo algal y/o biomasa algal generada de acuerdo a los métodos de la invención. En algunas modalidades, las composiciones de lípidos o algales comprendiendo las mismas se subdividen de acuerdo a
20 polaridad: lípidos neutrales y lípidos polares. La mayoría de los lípidos neutrales son triglicéridos y ácidos grasos libres saturados e insaturados. La mayoría de los lípidos polares son lípidos acílicos, tales como glicolípidos y fosfolípidos. En algunas modalidades, una composición que
25 comprende lípidos e hidrocarburos de la invención se

describen y distinguen por los tipos y cantidades relativas de ácidos grasos y/o hidrocarburos presentes en la composición. En algunas modalidades, los hidrocarburos presentes en las composiciones de alas de la invención son
5 mayormente alcanos y alquenos de cadena recta, y pueden incluir parafinas y similares teniendo hasta 36 átomos de carbono.

En algunas modalidades, la invención proporciona un método para hacer un combustible líquido que comprende
10 procesar los lípidos derivados de un cultivo algal y/o una biomasa algal ó una fracción de lípidos de los mismos descritos en la presente invención. Los productos de la invención hechos por el procesamiento algal derivado de alimentación de biocombustibles puede incorporarse o usarse
15 en una variedad de combustibles líquidos, incluyendo pero no estando limitados a, diese, biodiesel, queroseno, combustible de avión, gasolina, JP-1, JP-4, JP-5, JP-6, JP-7, JP-8, propulsor de jet térmicamente estable (JPTS), líquidos Fischer-Tropsch, combustibles basados en alcohol incluyendo
20 combustibles de transporte que contienen etanol, otros combustibles líquidos basados en biomasa incluyendo combustibles de transporte basados en biomasa celulósica.

En algunas modalidades, los triacilglicéridos en aceites algales se convierten en metil ésteres de ácidos
25 grasos (FAME o biodiesel), por ejemplo, usando un proceso de

transesterificación basado en catalizador (para un resumen ver, por ejemplo, K. Shaine Tyson, Joseph Bozell, Robert Wallace, Eugene Petersen y Luc Moens, "Biomass Oil Analysis: Research Needs and REcommendations, NREL/TP-510-34796, June 5 2004, incorporada por referencia en su totalidad en la presente). En algunas modalidades, los triacilglicéridos reaccionan con metanol en presencia de NaOH a 60°C por 2 horas para generar un metil éster de ácido graso (biodiesel) y glicerol. En una modalidad adicional, los coproductos de 10 biodiesel y glicerol son inmiscibles y típicamente separados corriente abajo a través de decantación o centrifugación, seguido de lavado y purificación. Los ácidos grasos libres (FFAs) son un producto de la hidrólisis natural de triglicéridos y se forman reaccionando triacilglicéridos y 15 agua. En algunas modalidades, los métodos de la invención comprenden además una etapa para secar rápidamente y sustancialmente el aceite algal por medio de técnicas conocidas en el arte para limitar la producción de ácidos grasos libres, preferentemente a menos de 1%. En otra 20 modalidad de la invención, los métodos pueden comprender además una etapa para convertir o remover los ácidos grasos libres mediante técnicas conocidas en el arte.

En algunas modalidades, los triacilglicéridos en aceites algales se convierten en metil ésteres de ácidos 25 grasos (FAME o biodiesel) por medio de transesterificación

con catalizador ácido, transesterificación con catalizador de enzima, o transesterificación con metanol supercrítico. La transesterificación con metanol supercrítico no requiere un catalizador (ver, por ejemplo, Kusdiana, D. y Saka, S. 5 "Effects of water on biodiesel fuel production by supercritical methanol treatment", Bioresource Technology 91 (2004), 289-295; Kusdiana, D. y Saka, S., "Kinetics of transesterification in rapeseed oil to biodiesel fuel as treated in supercritical methanol", Fuel 80 (2001), 693-698; 10 Saka, S., y Kusdiana, D. "Biodiesel fuel from rapeseed oil as prepared in supercritical methanol", Fuel 80 (2001), 225-231). La reacción en metanol supercrítico reduce el tiempo de reacción de 2 hrs a 5 minutos. Adicionalmente, la ausencia del catalizador base NaOH simplifica grandemente la 15 purificación corriente abajo, reduce los costos de materia prima, y elimina el problema con jabones de ácidos grasos libres. En lugar de ser un problema, los ácidos grasos libres se vuelen alimentaciones valiosas que se convierten en biodiesel en el metanol supercrítico como sigue.

20 En algunas modalidades, los triacilglicéridos se reducen con hidrógeno para producir parafinas, propano, dióxido de carbono y agua, un producto generalmente conocido como diesel verde. Las parafinas pueden ya sea isomerizarse para producir diesel o mezclarse directamente con el diesel. 25 En algunas modalidades, existen ventajas de hidrogenación

sobre la transesterificación basada en catalizador convencional. Por ejemplo, el proceso de hidrogenación (también referido como hidrocrqueo) es termoquímico y por lo tanto mucho mas robusto para alimentar impurezas comparado
5 con procesos bioquímicos (por ejemplo, hidrocrqueo es relativamente insensible a ácidos grasos libres y agua). Los ácidos grasos libres son fácilmente convertidos en parafinas, y el agua simplemente reduce la eficiencia térmica total del proceso pero no altera significativamente la química. En otro
10 ejemplo no limitativo, el producto de parafina es un hidrocarburo puro, y por lo tanto no distinguible de hidrocarburos basados en petróleo. A diferencia del biodiesel el cual tiene un contenido de energía bajo del 15% y que puede congelarse en climas fríos, el diesel verde tiene un
15 contenido de energía similar y características de flujo (por ejemplo, viscosidad) a diesel basado en petróleo. En varias modalidades, los métodos de la invención contienen las etapas de hidrocrqueo e isomerización, las cuales son bien conocidas en la técnica para producir combustibles líquidos,
20 tales como fluido para jets, diesel, queroseno, gasolina, JP-1, JP-4, JP-5, JP-6, JP-7, JP-8 y JPTS.

EJEMPLO

Los siguientes ejemplos se proporcionan con el fin
25 de demostrar e ilustrar además, ciertas modalidades

preferidas y aspectos de la presente invención y no se consideran limitativos del alcance de los mismo.

Ejemplo 1 - Crecimiento de biomasa algal con grasa alta

5 Los experimentos se realizaron durante el desarrollo de las modalidades de la invención con el fin de caracterizar y establecer métodos para la producción de alga heterotrófica, y en particular, métodos para cultivar algas con el fin de generar una biomasa algal que contiene niveles
10 altos de grasas/lípidos. Una serie de estudios de producción de alga heterotrófica se realizó y corrió en un lote.

 Un cultivo de *Schizochytrium limacinum* se obtuvo y almacenó en crioviales de 1.5 mL a -80°C. Para cada experimento, el proceso comenzó descongelando crioviales y
15 agregar asépticamente a un matraz agitado de 1.0 Lt de medio. El medio en el matraz de 1 Lt comprendió 50 g/Lt de azúcar, 10 g/Lt de extracto de levadura, y 4 g/Lt de sal de mar. Se usaron tres litros del cultivo viejo de 3 a 6 días del matraz agitado para inocular un recipiente de 250 Lt que contiene
20 media, creció por 24 a 48 hora, y luego se transfirió a un recipiente principal (17,000 a 28,000 Lt) y se corrió como un proceso de lote por 36 a 72 horas. La temperatura de las corridas de lote se mantuvieron entre 25 y 30°C. El rango de temperatura fue grande debido a la falta de control preciso
25 del sistema. El medio usado en la semilla (250 Lt) y en las

corridas del lote (17,000 a 28,000 Lt) fue como sigue:

	Materia prima	Loteado	
	Azúcar	50	g/Lt
5	Extracto de levadura	7.5	g/Lt
	MgSO ₄	0.1538	g/Lt
	Urea	2	g/Lt
	CaCl ₂	0.1538	g/Lt
10	MgCl ₂	0.1538	g/Lt
	Antiespuma	0.3	ml

Tabla 1A. Medio usado en un lote tradicional y cultivos de semilla

15 El contenido total de grasa de la biomasa algal de los lotes de cultivo se determinó por medio de cromatografía de gases (ver el método gravimétrico AOAC 922.06), hidrólisis ácida (ver Grasa Total por el Método de Tecnología Ankom de Hidrólisis Ácida 1, 02-10-09), la Extracción de Solvente de
 20 Alta Temperatura (Ver el Método de Tecnología Ankom 2, 01-30-09 y el Método AOCS 5-04). En breve, un procedimiento de análisis típico para fermentar caldo fue como sigue: las muestras de caldo se concentraron por centrifugación. Después de decantar, la muestra se liofilizó por 24 horas con una
 25 humedad resultante menor a uno por ciento. Las muestras se

pesaron antes de la hidrólisis ácida, se lavaron y se secaron en un horno. Esto fue seguido de un proceso de extracción bajo condiciones térmicas de gradiente con éter de petróleo. El proceso de hidrólisis y extracción realizaron utilizando instrumentos autómatas. Después de secado adicional, los resultados se determinaron en baso a pérdida de masa.

Como se muestra en la Tabla 1B abajo, los niveles totales de grasa/lípidos (peso/peso) alcanzado en las producciones de lote a un rango de temperatura de 25 a 30 °C fue de 8 a 38%

15

20

#Corrida de Log	Grasa Total (%)
A-1-10	33.75
A-2-10	38.59
A-3-10	27.30
A-4-10	38.51
A-5-10	7.82
A-7-10	33.33
A-8-10	34.85
A-9-10	27.21

Tabla 1B. Contenido total de grasa de biomasa algal crecida en corrida de lote entre 25 a 30 °C.

Se realizaron esfuerzos para aumentar las cantidades de los niveles de grasa/lípidos ya que estas cantidades se consideraron demasiado bajas para ser de valor y se corrieron experimentos adicionales en un esfuerzo por
 5 aumentar el nivel de lípidos producidos en el cultivo de algas.

Durante el desarrollo de las modalidades de la invención, los experimentos se realizaron con el fin de determinar si cambios en los constituyentes y/o cantidades de
 10 proporción de los mismos en el medio, podían proporcionar diferentes características de crecimiento algal. Adicionalmente, los experimentos se realizaron para determinar si el escalamiento de un sistema de cultivo algal podría alterar las características de crecimiento algal. En
 15 particular, las cantidades y proporciones de $MgSO_4$, Urea, $CaCl_2$, $MgCl_2$, y KH_2PO_4 se modificaron en un intento de incrementar el nivel de lípidos producidos en el cultivo de algas.

Los resultados de fermentaciones producidas en un
 20 volumen de lote de 10 Lt se muestran abajo:

	corridas de pruebas de lab 10Lt					
25	Ingredientes /# log	NB4-030311	NB6-030311	NB4- 032311	NB6- 032311	NB3- 032811 NB4- 032811

	(g/Lt)					
	Azúcar	50	50	50	50	50
	Extracto de Levadura	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
5	MgSO4	0.1538	0.1538	0.1538	0.1538	0.5
	NaCl	0	0	0	0	0
	Urea	2	2	2	2	1
	ZnSO4	0.1538	0.1538	0.1538	0.1538	0.1538
	CaCl2	0.1538	0.1538	0.1538	0.1538	1
10	MgCl2	0.1538	0.1538	0.1538	0.1538	0.5
	KH2PO4			1.5	1.5	0.5
	Trazas (líquido) - ml	10	10	10	10	20
15	Cloruro férrico					
	Sulfato de Zn					
20	Sulfato de Mn					
	Acido bórico					
	Sulfato de cobre					
	Alimentación					
25	Urea:KH ₂ PO ₄	urea 200 g/Lt	urea 200 g/Lt	2:1	2:1.5	2:0.5

5	Temperatura de punto de ajuste	30	30	30	30	30	30
	% grasa	8.13	6.89	88.98	84.28	56.1	64.3
	Notas	fuerte olor a NH3	fuerte olor a NH3				
		problemas de pH	problemas de pH				
10		espuma fuera	espuma fuera				

Tabla 2. 10 Lt resultados y condiciones de fermentación

15	Ingredientes/# log	NB6- 032811	NB3- 040711	NB4- 04711	NB6- 040711	NB3- 041911	NB4041 911	NB60419 11
	(g/Lt)							
	Azúcar	50	50	50	50	50	50	50
	Extracto de Levadura	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
20	MgSO4	2	2	2	2	2	2	2
	NaCl	0	0	0	0	0	0	0
	urea	1	1	1	1	1	1	1
	ZnSO4	0.1538	0.1538	0.1538	0.1538	0	0	0
25	CaCl2	4	4	4	4	4	4	4
	MgCl2	2	2	2	2	2	2	2

	KH ₂ PO ₄	2	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
5	Trazas (líquido) - ml	20	20	20	20	20	20	20
	Cloruro férico							
	Sulfato de Zn							
10	Sulfato de Mn							
	Ácido bórico							
	Sulfato de cobre							
15	Alimentación							
	Urea:KH ₂ PO ₄	2:0.5	2:0.5	2:0.5	2:0.5			
	temperatura de punto de ajuste	30	30	30	30	30	30	30
20	% de grasa	73.7	71.16	73.49	73.88	68.69	76.56	72.56

Tabla 3. 10 Lt resultados y condiciones de fermentación adicionales

5	Ingredientes/# Log	NB30614	NB40514	NB60614	NB30621	NB40621	NB60321	NB30628	NB40628	NB6032811
		11	11	11	11	11	11	11	11	
	(g/Lt)									
	Azúcar	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	Extracto de levadura	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
10	MgSO4	0.1538	2	2	2	2	2	0.1538	2	2
	NaCl	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Urea	2	1	1	1	1	1	1	1	1
	ZnSO4	0.1538	0.1538	0	0	0	0	0	0	0
	CaCl2	0.1538	4	4	4	4	4	4	0.1538	4
15	MgCl2	0.1538	2	2	2	2	2	2	2	0.1538
	KH2PO4	2	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
	Trazas (líquido) - ml	10	10	0	0	0	0	0	0	0
	Cloruro férrico									
	Sulfato de Zn									
20	Sulfato de Mn									
	Ácido bórico									
	Sulfato de cobre									
	Alimentación									
	Urea: KH2PO4	2:0.5	2:0.5	2:0.5	2:0.5	2:0.5	2:0.5	2:0.5	2:0.5	2:0.5
25	Temperatura de punto de ajuste	30	30							
	% de grasa	46.52	65.04	67.61	61.28	62.95	68.53	49.25	54.41	64.97
		Confirmación fomular			Efectos NaCl			Efectos de proporción de sal		

Tabla 4. 10 Lt resultados y condiciones de fermentación adicionales

Estos experimentos, ser realizaron durante el
5 desarrollo de las modalidades de la presente invención,
indicando que ciertas cantidades/proporciones de sustratos
presentes dentro del medio, tuvieron un impacto directo en
las características de crecimiento algal (por ejemplo,
biomasa total alcanzada así como cantidad de grasa y/u otros
10 contenidos de componentes dentro de la biomasa por si misma).
Los parámetros que proporcionaron una biomasa con contenido
alto de grasa en las corridas de 10L se utilizaron para
determinar si serían exitosos para la producción a gran
escala de una biomasa con alto contenido de grasa.

15

Ejemplo 2 - Producción a gran escala de biomasa algal
con alto contenido de grasa

Los intentos iniciales para generar una biomasa
algal heterotrófica descritos en el Ejemplo 1 arriba,
20 utilizaron procedimientos basados en los procesos de
fermentación de la levadura. Los procesos se corrieron en
lote debido a las limitaciones en el edificio de producción
(Nicholasville, KY) y temperaturas que sólo podían
controlarse entre 25 y 30 °C. El rango de temperatura fue
25 grande debido a la falta de control preciso del sistema. Como

se indica en la Tabla 1, arriba, los niveles de grasa alcanzados en la planta de Nicholasville, KY están en el rango de 8-38%. Sin embargo, como se indicó arriba, se realizaron experimentos adicionales durante el desarrollo de las modalidades de la presente invención que proporcionaron la identificación de ciertas proporciones/cantidades de sustratos que pueden utilizarse durante la producción de biomasa algal heterotrófica para alterar el crecimiento algal y la generación y propiedades de la biomasa. Modificaciones de los niveles y proporciones del medio (por ejemplo, MgSO_4 , Urea, CaCl_2 , MgCl_2 y KH_2PO_4) durante la fermentación se identificó y caracterizó para alterar el crecimiento algal, y para generar una biomasa con propiedades significativamente diferentes (incluyendo medio conteniendo las proporciones/cantidades identificadas de los sustratos efectivas en la generación de una biomasa algal con alto contenido de grasa (por ejemplo, mayora a 67% de contenido de grasa)) y fue adicionalmente probado y se corrido a gran escala y también como un lote alimentado (por lo tanto permitiendo la modificación y control de cantidades de nitrógeno, fósforo, potasio, y carbono durante la corrida).

Un cultivo de *Schizochytrium limacinum* se obtuvo y almacenó en crioviales de 1.5 ml a -80°C . Para cada cultivo, se descongeló un criovial y se agregó asépticamente a un matraz agitado de 1.0 Lt de medio. El medio en los matraces

de 1 Lt comprendió los componentes que se muestran en la
Tabla 5:

	Ingrediente	Loteado	Fabricante
5	Azúcar	50 g/Lt	Cargill - Hammond, In, EUA
	Extracto de levadura	10 g/Lt	Sensient - Indianapolis, In, EUA
	Sal de mar	4 g/Lt	Sigma-Aldrich - St. Louis, Mo, EUA

Tabla 5. Medio usado para 1.0 Lt de cultivo.

10 la temperatura de los matraces agitados conteniendo
Schizochytrium limacinum en el medio se mantuvieron a 30°C y
se agitaron a 250 rpm hasta dicho tiempo en el que el alga ha
entrado a la fase de crecimiento logarítmica/exponencial pero
antes del agotamiento de la glucosa en el medio (usualmente
15 72-144 horas).

Los contenidos de los matraces de cultivo de 1 Lt
fueron entonces asépticamente transferidos en botellas de
aspiración de 2.0 Lt con conectores estériles que se usaron
para conectarse a grandes recipientes (recipientes de 40 Lt a
20 27 Lt o 18 Lt). De esta manera, los cultivos en los matraces
de cultivo de 1 Lt se usaron como inóculo y se agregó
asépticamente al recipiente de semilla (ya sea a 40 Lt o 27
Lt o 18 Lt) conteniendo el medio descrito en la Tabla 6 abajo
indicada:

5

Ingrediente	Loteado	Fabricante
Azúcar	50	Cargill - Hammond, In, EUA
Extracto de levadura	7.5	Sensient - Indianapolis, In, EUA
MgSO ₄	0.1538	Norkem Limited - Kutahya, Turquía
CaCl ₂	0.1538	Occidental Chemical Company - Dallas, Tx
MgCl ₂	0.1538	North American Salt Company - Overland park, KS

10 Tabla 6. Medio usado para primeros cultivos de semilla de 18 Lt ó 27 Lt.

La primera etapa de semilla (40/18/27 Lt) se corrió a 30°C, bajo condiciones de flujo de aire y agitación para
 15 mantener oxígeno disuelto a o por arriba de 10%, y hasta al menos 20 g/Lt de glucosa fue consumida. Cuando crecen bajo condiciones estériles, no se requiere ningún control de pH. En lugar de esto, el pH se mantuvo dentro de un rango sano a través del proceso de fermentación. La primera etapa de
 20 semilla (40/18/27 Lt) se consideró completa cuando el crecimiento algal fue dentro de la etapa de crecimiento log/exponencial, las glucosa no se agotó del medio, pero al menos 20 g/Lt de la glucosa se ha consumido (en general, esto ocurrió entre aproximadamente 24-48 horas). Un recipiente
 25 grande (4000/2000 Lt) se alistaron para el cultivo de primera

etapa de semilla (por ejemplo, se llenó con medio y se llevó hasta 30°C bajo condiciones estériles).

Cuando se completó el primer cultivo de semilla, los contenidos de la primera etapa de semilla (40/18/27 Lt) el recipiente de cultivo se transfirió a un recipiente con al menos 2,000 Lt de medio descrito en la Tabla 7, abajo mostrada:

10	Ingrediente	Loteado	Fabricante
	Azúcar	50	Cargill - Hammond, In, EUA
	Extracto de levadura	7.5	Sensient - Indianapolis, In, EUA
	MgSO ₄	0.1538	Norkem Limited - Kutahya, Turquía
	CaCl ₂	0.1538	Occidental Chemical Company - Dallas, Tx
	MgCl ₂	0.1538	North American Salt Company - Overland park, KS

15 Tabla 7. Medio usado para segundos cultivos de semilla para 4,000/2,000 Lt

Esta segunda etapa de cultivo de semilla (4000/2000 Lt) se corrió a 30°C, bajo condiciones de flujo de aire y agitación para mantener el oxígeno disuelto a o por arriba de 10%, y hasta que al menos 20 g/Lt de glucosa se ha consumido. Cuando crece bajo condiciones estériles, no se requiere ningún control de pH. En lugar de esto, el pH se mantuvo dentro de un rango sano a través del proceso de fermentación. La semilla de segunda etapa (4000/2000 Lt) se consideró

completa cuando el crecimiento algal estuvo dentro de la etapa de crecimiento log/exponencial, la glucosa no se agotó del medio, pero al menos 20 g/Lt de la glucosa se consumió (en general, esto ocurrió entre aproximadamente 24-48 horas).

5 Cuando se completó el segundo cultivo de semilla (4000/2000 Lt), los contenidos del segundo cultivo de semilla se transfirieron asépticamente a un tercer recipiente de cultivo con un volumen en el rango entre 70,000 Lt a 220,000 Lt de medio estéril a 30°C como se describe en la Tabla 8,
10 abajo mostrada:

Lote		
Materia prima	Loteado	Fabricante
Azúcar	50 g/Lt	Cargill - Hammond, In, EUA
Extracto de levadura	7.5 g/Lt	Sensient - Indianapolis, In, EUA
MgSO ₄	4 g/Lt	Norkem Limited - Kutahya, Turquía
Urea	1 g/Lt	PCS Sales - Northbrook, Il
CaCl ₂	2 g/Lt	Occidental Chemical Company - Dallas, Tx
MgCl ₂	2 g/Lt	North American Salt Company - Overland park, KS
KH ₂ PO ₄	0.25 g/Lt	Lidochem - Hazlet, NJ

20 Cuando 30 g/Lt de glucosa se han consumido por el alga presente en el tercer recipiente de cultivo (recipiente de 70,000 - 220,000 Lt), la glucosa y las alimentaciones de lote alimentado se comenzaron. La glucosa se mantuvo a 10 g/Lt durante el cultivo a gran escala de alga en el tercer
25 recipiente de cultivo (recipiente de 70,000 - 220,000 Lt).

Como se describe en la Tabla 9 abajo mencionada, la alimentación utilizada para el proceso de lote alimentado comprendió:

	Alimentación		
5	Ingrediente	g/Lt	Fabricante
	Urea	2 g/Lt	PCS Sales - Northbrook, Il
	KH ₂ PO ₄	0.5 g/Lt	Lidochem - Hazlet, NJ

Tabla 9. Alimentación usada para el proceso de lote alimentado.

10

La alimentación de lote alimentado se agregó por arriba de un período de 34 horas. Aunque no se necesita un entendimiento del mecanismo para practicar la presente invención, y ya que la presente invención no está limitada a algún mecanismo de acción en particular, en algunas modalidades, este período de tiempo se identificó en baso a la observación que tomó aproximadamente 20 horas para que la alimentación comenzara (para 30 g/Lt de glucosa a ser consumida por el alga presente en el tercer recipiente de cultivo). La alimentación se detuvo entonces (por ejemplo, alrededor de la hora log 54) con el fin de permitir que todos los nutrientes se removieran (consumidos) del medio. La cosecha de la biomasa algal se llevó a cabo hasta la terminación de crecimiento exponencial, ocurrida generalmente entre las horas log 66-76.

El caldo de cultivo fue centrifugado para quitar las aguas residuales bajo condiciones para alcanzar sólidos en un 15-30%, con el concentrado de secado por aspersión para remover el agua a una humedad final de menos de 5%.

5 Los resultados de varios cultivos independientes, a gran escala se muestran en la Figura 1 y las Tablas 10 a 12 abajo mostradas:

10

Número de corridas	% de Grasa (muestra cosechada)	Biomasa de vol. ajustado (g/Lt)	% de recuperación de centrífuga	% de grasa (producto secado por aspersión)	% proteína (producto secado por aspersión)	% de humedad (producto secado por aspersión)
F1-2-11	60.7*	86.2		75.7	11.66	1.47
F1-3-11	69.64	86.4	55	70.25	16.47	1.37
F1-4-11	74.76	66.5	67	71.56	15.92	2.11
F1-5-11	73.12	70.8	68	65.65	17.14	2.43
15 F1-6-11	62.77**	45.7	89	54.8	13.35	2.14
F2-1-11	72.59	50.9	87	65.89	17.64	2.72
F2-2-11	70.81	59.5	52	66.49	15.29	2.15

20 Tabla 10. Resultados de la producción de cultivo a gran escala.

* muestra mala cosechada

** problemas de control de proceso con este lote

- F1-2-11

25 o Tuvo un volumen de lote de 70,000 Lt y un volumen cosechado de 93,700 Lt.

- F1-3-11
 - o Tuvo un volumen de lote de 70,000 Lt y un volumen cosechado de 84,000 Lt.
- F1-4-11
 - 5 o Tuvo un volumen de lote de 70,000 Lt y un volumen cosechado de 82,300 Lt.
- F1-6-11
 - o Tuvo un volumen de lote de 80,000 Lt y un volumen cosechado de 83,600 Lt.
- 10 • F2-1-11
 - o Tuvo un volumen de lote de 110,000 Lt y un volumen cosechado de 113,000 Lt.
- F2-2-11
 - o Tuvo un volumen de lote de 110,000 Lt y un volumen cosechado de 125,600 Lt.
- 15

La biomasa generada de cada cultivo de gran escala de lote alimentado se caracterizó, incluyendo un análisis de contenido de grasa total (grasa saturada e insaturada);

20 humedad, contenido de ácido docosaheptaenóico (DHA), contenido de ácido palmítico, contenido de proteína cruda y contenido de ceniza (Ver, por ejemplo, Contenido de grasa y/ Humedad- AOCS Am 5-04 "Rapid Determination of Oil/Fat Utilizing High

Temperatur Solvent Extraction", v. 3/31/10: DHA/Palmítico -

25 AOCS Método Ce 1b-89 y AOAC Método de Análisis 991.39;

Proteína - AOAC 990.03; Ash - AOAC 942.05 ajuste de volumen de biomasa (g/Lt) - Stone, et. al. Dry Weight Measurement of Microbial Biomass and Measurement Variability Analysis. Biotechnology Techniques. Vol. 6:207-212.)

5

10

15

20

Número de corridas/Comentarios	% de Grasa (cosecha final)	Humedad (%) max 6%	DHA (mg/g)	Palmitico (mg/g)	Proteína Cruda (%) Reporte liberado	Ceniza max 10%
SL-F1-1-11	72.70	1.39	191.8	379	14.96	3.5
SL-F1-3-11	69.64	1.37	181.1	366.2	16.47	3.08
SL-F1-4-11	73.71	2.11	185.8	373.8	15.92	3.11
SL-F1-5-11	73.12	2.43	176.8	351.3	17.14	0.0373
SL-F2-1-11	72.59	2.72	252.4	360.9	17.64	0.0363
SL-F2-2-11	70.81	2.15	247.2	365	15.29	0.041
SL-F2-3-11	72.86	2.50	197.36	269.4	11.58	3.29
SL-F2-4-11	69.03	3.07	177.9	133.65	18.23	3.9
SL-F2-5-11	70.10	2.12	203.24	193.99	10.93	0.0342
SL-F2-6-11	73.55	2.61	203.99	206.67	12.01	3.34
SL-F2-8-11	70.86	1.91	190.31	287.79	12.71	3.3
SL-F2-9-11	76.89	1.68	191.69	227.52	9.62	3
SL-F1-8-11	76.31	1.55	191.41	318	10.71	3.8
SL-F2-10-11	72.15	1.75	186.24	256.13	13.37	4.81
SL-F2-11-11	73.64	2.49	184.34	299.77	11.45	4.42
SL-F1-9-11	75.57	1.28	202.15	250.01	10.02	3.48
SL-F2-13-11	70.95	1.66	182.82	326.94	12.39	4.59
SL-F2-14-11	69.13	1.42	196	253.11	14.79	3.65
SL-F1-13-11	67.56	1.73	184.66	212.92	15.1	3.97
SL-F1-14-11	68.57	1.23	170.16	89.35	11.86	4.22
SL-F3-4-11	68.8	1.56	203.25	183.65	15.31	3.84
SL-F1-15-11	70.58	1.14	175.58	147.37	9.8	3.56
SL-F1-16-11	72.72	1.31	175.28	91.4	10.43	4.06
SL-F3-8-11	71.75	1.8	207.95	138.37	14.32	3.65
SL-F5-5-11	68.7	1.23	189.07	119.72	11.68	3.42
SL-F1-25-11	74.801	1.54			9.16	3.68
SL-F3-14-11	76.24	1.90			8.41	3.08
SL-F3-15-11	75.80	1.08			7.3	3.26
SL-F1-1-12	70.24				8.3	3.51

25 Tabla 11. Caracterización de cultivos a gran escala

	Número de corridas/Comentarios	% de Grasa (cosecha final)	Humedad (%) max 6%	DHA (mg/g)	Palmitico (mg/g)	Proteína Cruda (%) Reporte liberado	Ceniza max 10%
	SL-F1-25-11	74.80	1.54	170.63	355.6	9.16	3.68
	SL-F3-14-11	76.24	1.90	179.85	346.41	8.41	3.08
	SL-F3-15-11	75.80	1.08	182.81	367.01	7.3	3.26
	SL-F1-1-12	70.24	1.81	160.84	336.77	8.3	Liberado
	SL-F4-1-12	68.53	1.71	189.06	332.29	10.26	3.56
	SL-F6-2-12	69.13	1.73	169.44	351.39	7.75	3.11
5	SL-F5-2-12	75.00	1.84	175.05	371.57	6.89	3.5
	SL-F4-2-12	69.10	1.84	198.24	341.94	8.85	3.88
	SL-F6-3-12	69.34	1.80	175.42	340.86	10.44	3.62
	SL-F5-3-12	67.28	3.61	176.61	360.01	10.19	3.56
	SL-F1-2-12	71.09	1.72	154.22	371.31	12.56	3.78
	SL-F1-4-12	68.42	1.66	159.54	375.98	12.88	3.81
	SL-F4-5-12	70.89	1.88	171.73	397.13	12.38	3.1
	SL-F6-6-12	70.38	1.8	155.05	377.11	12.56	3.71
10	SL-F5-6-12	68.17	1.75	155.73	389.31	10.56	3.8
	SL-F3-3-12	73.64	1.94	156.25	393.08	12.13	3.52
	SL-F1-7-12	71.97	1.58	164.05	362.4	8.75	3.98
	SL-F3-4-12	70.93	2.37	183.88	366.83	10.13	2.23
	SL-F6-7-12	70.95	2.66	176.68	366.29	10.56	4.31
	SL-F1-8-12	72.08	1.94	172.91	407.2	9	3.62
	SL-F3-3-12	72.15	1.85			10.56	7.56
	SL-F3-7-12	69.63	2.42			10.57	3.67
	SL-F3-8-12	71.77	1.78				
15	SL-F3-9-12	69.18	1.74				

Tabla 12. Caracterización de cultivos a gran escala

Adicionalmente, el perfil de ácido graso de la biomasa fue caracterizado. Como se muestra en la Figura 2, el perfil de ácido graso de cada biomasa algal generada es altamente similar/consistente, independiente del contenido total de grasa de la biomasa. Un perfil de compuesto de ácido graso, considerando los perfiles colectivos de todas las muestras analizadas, se proporcionan en la Figura 3.

El perfil de glicérido también se determinó para cada biomasa algal. Del total de contenido de glicérido de la biomasa, aproximadamente 4-8% en donde los diglicéridos, menores a 1% de glicerol, aproximadamente 3-7% monoglicéridos y aproximadamente 84-88% triglicéridos.

Ejemplo 3 - Cultivo de Biomasa

Los experimentos realizados durante el desarrollo de las modalidades de la invención identificaron que el aumento en los niveles de grasa total en la biomasa causaron problemas significativos con respecto a la centrifugación de la biomasa algal. La recuperación del contenido de biomasa post configuración está en el rango de únicamente aproximadamente 45-85% del peso total de la biomasa. Esto se

Número de corridas/Comentarios	% de Grasa (muestra de cosecha)	Biomasa de vol. ajustado (g/Lt)	% proteína (producto cosechado)	% de recuperación de centrifugación	% de grasa (producto seco por aspersión)	% de proteína (producto seco por aspersión)	% de humedad (producto seco por aspersión)
F1-2-11	60.7	86.2	NA	NA	75.7	11.66	1.47
F1-3-11	69.64	86.4	NA	55	70.25	16.47	1.37
F1-4-11	74.76	66.5	NA	67	71.56	15.92	2.11
F1-5-11	73.12	70.8	16.14	68	65.65	17.14	2.43
F1-6-11	62.77**	45.7	NA	89	54.8	13.35	2.14
F2-1-11	72.59	50.9	16.29	87	65.89	17.64	2.72
F2-2-11	70.81	59.5	12.59	52	66.49	15.29	2.15

Tabla 13. Comparación del rendimiento de grasa y proteína de una muestra de cosecha directa contra producto seco por aspersión.

*muestra cosechada mala** problemas de control de proceso con este lote

- F1-2-11
 - o Tuvo un volumen de lote de 70,000 Lt y un volumen cosechado de 93,700 Lt.
- F1-3-11
 - 5 o Tuvo un volumen de lote de 70,000 Lt y un volumen cosechado de 84,000 Lt.
- F1-4-11
 - o Tuvo un volumen de lote de 70,000 Lt y un volumen cosechado de 92,300 Lt.
- 10 • F1-5-11
 - o Tuvo un volumen de lote de 70,000 Lt y un volumen cosechado de 82,300 Lt.
- F1-6-11
 - o Tuvo un volumen de lote de 80,000 Lt y un volumen cosechado de 83,600 Lt.
- 15 • F2-1-11
 - o Tuvo un volumen de lote de 110,000 Lt y un volumen cosechado de 113,000 Lt.
- F2-2-11
 - 20 o Tuvo un volumen de lote de 110,000 Lt y un volumen cosechado de 125,600 Lt.

Los problemas de recuperación se identificaron como atribuibles al aumento en la cantidad de baja densidad en la biomasa de lípidos/aceite. De esta manera, los experimentos

se realizaron durante las modalidades de la presente invención en un esfuerzo por tratar este problema.

Un acercamiento que demostró la habilidad para mejorar la recuperación de la biomasa fue el enfriar el cultivo que comprendía la biomasa algal antes de la configuración. Aunque no necesita un entendimiento del mecanismo para practicar la invención, y la invención no está limitada a un mecanismo de acción particular, en algunas modalidades, el enfriar el cultivo aumentó la densidad de los lípidos/aceites y permitió una recuperación mayor de la biomasa.

Los experimentos se realizaron con el fin de determinar los efectos de enfriar la biomasa antes de la configuración.

Prueba de laboratorio uno: 2 galones de caldo se recolectaron y almacenaron a 7-8°C por 16 horas más. Se recolectaron ocho X tubos de centrífuga de 50 ml y se colocaron en un baño de agua para alcanzar las temperaturas objetivo descritas en la tabla 14 abajo mencionada. Todas las muestras se centrifugaron a 5000 rpm por 5 minutos.

Temperatura (°C)	Observación Visual
10	Excelente separación sin células flotantes. Sobrenadante claro
20	Buena separación sin células flotantes. Más turbio de 10°C
25	Similar a 20°C; más turbio
30	Buena separación sin células flotantes; turbio
35	Buena separación sin células flotantes; muy turbio
40	Aun separándose; células flotantes; sobrenadante lechoso
45	Separación pobre
50	Casi sin separación con numerosas células flotantes

Tabla 14. Temperatura de cultivo y resultados de centrifugación de la prueba 1.

Prueba de laboratorio 2: Muestras de caldo fres se recolectaron y probaron en un rango de temperatura de 10 a 30°C. No se refrigeraron por la noche como en la prueba 1. A todas las muestras se les permitió sentarse en un baño de agua de hielo a una temperatura objetivo. Las muestras se centrifugaron a 5000 rpm por 5 minutos.

10

15

Temperatura (°C)	Observación Visual	Densidad (g/ml)
10	Excelente separación sin células flotantes. Sobrenadante claro	1.01967
15	Buena separación sin células flotantes. Sobrenadante muy turbio.	
20	Muestra aun separándose; floculación visible	
25	Muy similar a 20°C; turbiedad aumentando	
30	Aun Buena separación; turbiedad aumentando	1.02915

Tabla 13. Temperatura de cultivo y resultados de centrifugación de la prueba 2.

20

25

Como se describe en el Ejemplo 2 y la Figura 1, durante la producción en gran escala, el enfriar la biomasa antes de la recuperación (centrifugación) nos lleva a un aumento significativo en la recuperación total de la biomasa. Corridas múltiples de gran escala han sido completadas con la

recuperación total de aproximadamente 95%.

Todas las publicaciones y patentes mencionadas en la descripción arriba son incorporadas en la presente invención por referencia. Varias modificaciones o variaciones de las composiciones descritas y métodos de la invención serán aparentes para aquellos expertos en la materia sin que se alejen del alcance y espíritu de la invención. Aunque la invención ha sido descrita en conexión con las modalidades preferidas específicas, deberá de entenderse que la invención como se reivindica no deberá de ser limitativa a dichas modalidades específica. De hecho, varias modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que son obvias para aquellos expertos en la materia en los campos relevantes son con intención de estar dentro del alcance de la presente invención.

20

25

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para fabricar una biomasa algal caracterizada porque comprende, al menos 67% de grasa total
5 que incluye cultivar un alga bajo condiciones de cultivo suficientes para proporcionar una biomasa algal que comprende 67% o más de grasa total.

2. El proceso de conformidad con la reivindicación
10 1, caracterizado porque la biomasa algal se cultiva en dos o más tipos de medio de cultivo en una manera secuencial.

3. El proceso de conformidad con la reivindicación
2, caracterizado porque un medio de cultivo de dos o más
15 medios de cultivo contiene 50 g/Lt de una fuente de carbono, aproximadamente 7.5 g/Lt de extracto de levadura, aproximadamente 0.15 g/Lt de sulfato de magnesio, aproximadamente 0.15 g/Lt de cloruro de calcio y 0.15 g/Lt de cloruro de magnesio.

20

4. El proceso de conformidad con la reivindicación
3, caracterizado porque la fuente de carbono es azúcar.

5. El proceso de conformidad con la reivindicación
25 4, caracterizado porque el azúcar es glucosa.

6. El proceso de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque un medio de cultivo de los dos o más medios de cultivo contiene 50 g/Lt de una fuente de carbono, aproximadamente 7.5 g/Lt de extracto de levadura, aproximadamente 4.0 g/Lt de sulfato de magnesio, aproximadamente 1 g/Lt de urea, aproximadamente 2 g/Lt de cloruro de calcio, aproximadamente 2 g/Lt de cloruro de magnesio y aproximadamente 0.25 g/Lt de fosfato de monopotasio.

10

7. El proceso de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado porque la fuente de carbono es azúcar.

8. El proceso de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque el azúcar es glucosa.

9. El proceso de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque el medio de cultivo de dos o más medios de cultivo contiene una fuente de carbono, extracto de levadura y sal de mar.

10. El proceso de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado porque la fuente de carbono es azúcar.

11. El proceso de conformidad con la reivindicación

10, caracterizado porque el azúcar es glucosa.

12. El proceso de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque las algas se cultivan en un primer medio de cultivo que contiene glucosa, extracto de levadura y sal de mar; se transfiere dentro y se incuba en un segundo medio de cultivo que contiene glucosa, extracto de levadura, sulfato de magnesio, cloruro de calcio y cloruro de magnesio; y se transfiere dentro y se incuba en un tercer medio de cultivo que contiene glucosa, extracto de levadura, sulfato de magnesio, urea, cloruro de calcio, cloruro de magnesio y fosfato de monopotasio.

13. El proceso de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque el tercer medio de cultivo se proporciona con una alimentación de lote alimentado.

14. El proceso de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque la alimentación de lote alimentado comprende urea y fosfato de monopotasio.

15. El proceso de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque la biomasa algal se cosecha a partir de un tercer medio de cultivo entre 12 a 24 horas después de que cesa el proceso de lote alimentado.

16. El proceso de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque la biomasa algal se cultiva a partir de un tercer medio de cultivo después de que todos los nutrientes han sido removidos/consumidos del medio.

5

17. El proceso de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque la biomasa algal se cultiva vía centrifugación del tercer medio de cultivo que comprende la biomasa algal.

10

18. El proceso de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque el tercer medio de cultivo se enfría antes de cosechar la biomasa algal.

15

19. El proceso de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado porque el tercer medio de cultivo se enfría entre aproximadamente 5 y 25°C.

20. El proceso de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el algo es *Schizochytrium limacinum*.

21. El proceso de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque el primer medio de cultivo contiene aproximadamente 50 g/Lt de glucosa, aproximadamente 10 g/Lt de extracto de levadura y aproximadamente 4 g/Lt de sal de

25

mar.

22. El proceso de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque el segundo medio de cultivo contiene
5 aproximadamente 50 g/Lt de glucosa, aproximadamente 7.5 g/Lt de extracto de levadura, aproximadamente 0.15 g/Lt de sulfato de magnesio, aproximadamente 0.15 g/Lt de cloruro de calcio y 0.15 g/Lt de cloruro de magnesio.

10 23. El proceso de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque el tercer medio de cultivo contiene aproximadamente 50 g/Lt de glucosa, aproximadamente 7.5 g/Lt de extracto de levadura, aproximadamente 4.0 g/Lt de sulfato de magnesio, aproximadamente 1 g/Lt de urea, aproximadamente
15 2 g/Lt de cloruro de calcio, aproximadamente 2 g/Lt de cloruro de magnesio y aproximadamente 0.25 g/Lt de fosfato de monopotasio.

24. El proceso de conformidad con la reivindicación
20 1, caracterizado porque la condiciones de cultivo comprenden correr el cultivo de algas a 30°C bajo condiciones de flujo de aire y agitación para mantener el oxígeno disuelto a 10%.

25 25. El proceso de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque las algas se cultivan bajo

condiciones estériles.

26. Una biomasa algal con un contenido de grasa total de al menos 67% en peso, caracterizado porque comprende
5 aproximadamente 170 a 250 mg/g de ácido docosaheptaenóico (DHA) y aproximadamente 150 a 400 mg/g de ácido palmítico.

27. Una composición de lípidos preparada a partir de la biomasa algal de conformidad con la reivindicación 26.
10

28. Un producto alimenticio caracterizado porque comprende la composición de lípidos de conformidad con la reivindicación 27.

29. Un producto alimenticio caracterizado porque comprende la biomasa algal de conformidad con la reivindicación 26.
15

30. Una biomasa algal caracterizada porque tiene un
20 contenido de grasa total de al menos 67% en peso.

31. El uso de una biomasa algal que tiene un contenido de grasa total de al menos 67% en peso, en la preparación de un biocombustible.
25

32. El uso de conformidad con la reivindicación 31,
en donde el biocombustible es biodiesel.

5

10

15

20

25

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con composiciones que comprenden algas con un alto contenido de
5 lípidos y métodos para hacer y utilizar las mismas. En particular, la invención se relaciona con biomasa de algas con un alto contenido de lípidos y materiales algales de lípidos derivados de las mismas, métodos para hacer las mismas, así como biocombustibles (por ejemplo, biodiesel) y
10 una composición dietética (por ejemplo, comida para animales) que comprenden o están hechas de las mismas. Las composiciones y métodos de la invención encuentran su uso en una variedad de aplicaciones incluyendo de biocombustibles, dietéticas (por ejemplo, nutrición humana y animal),
15 terapéuticas así como aplicaciones en investigación.

20

25

5

10

15

F2-2-11

#2011	Fecha de publicación	# Orden de producción	Recipiente/ # de corrida	Origen	Volumen del lote (Lt)	Volumen del Tanque Final (Lt)	Biomasa g/Lt	Volumen ajustado (g/L)	% de grasa
8	20110609	313486	F2-2-11	Semilla	120000	123,600	53.71	55.32	70.81

(**SL-F2-2-11**) fue inoculado en 5-31-11 de (G1A en hora log 73). Esta corrida se loteó a 110,000 litros con medio basado en 120,000 litros.

1100 litros de medio de lote alimentado se agregó por un período de 38 horas entre horas log 24-62. **53,372** lbs de glucosa se agregaron durante esta corrida. La cosecha empezó en 06-03-11 en hora log 73. Esta corrida fue limpia y secada por aspersión.

F2-3-11

#2011	Fecha de publicación	# Orden de producción	Recipiente/ # de corrida	Origen	Volumen del lote (Lt)	Volumen del Tanque Final (Lt)	Biomasa g/Lt	Volumen ajustado (g/L)	% de grasa
10	20110705	314418	F2-3-11	Semilla	120,000	123,300	57.40	59.94	72.86

(**SL-F2-3-11**) fue inoculado en 6-23-11 de (G1A en hora log 72). Esta corrida se loteó a 110,000 litros con medio basado en 120,000 litros.

1100 litros de medio de lote alimentado se agregó por un período de 34 horas entre horas log 24 y 58. **64,693** lbs de glucosa se agregaron durante esta corrida. La cosecha empezó en 06-27-11 en hora log 89. Esta corrida fue limpia y secada por aspersión.

F2-4-11

#2011	Fecha de publicación	# Orden de producción	Recipiente/ # de corrida	Origen	Volumen del lote (Lt)	Volumen del Tanque Final (Lt)	Biomasa g/Lt	Volumen ajustado (g/L)	% de grasa
11	2011079	314682	F2-4-11	Semilla	120,000	114,700	29.11	27.83	69.03

Fig. 1

(**SL-F2-4-11**) fue inoculado en 7-01-11 de (G1A en hora log 52). **1100** litros de medio de lote alimentado se agregó por un período de 34 horas entre horas log 34 y 68. **64,693** lbs de glucosa se agregaron durante esta corrida. La cosecha empezó en 07-05-11 en hora log 86. Esta corrida fue limpia y secada por aspersión.

F2-3-11

#2011	Fecha de publicación	# Orden de producción	Recipiente/ # de corrida	Origen	Volumen del lote (Lt)	Volumen del Tanque Final (Lt)	Biomasa g/Lt	Volumen ajustado (g/L)	% de grasa
13	20110718	314973	F2-5-11	Semilla	120,000	131,200	64.15	70.14	70.1

(**SL-F2-5-11**) fue inoculado en 7-08-11 de (G1A en hora log 52). Esta corrida se loteó a 110,000 litros con medio basado en 120,000 litros. **1100** litros de medio de lote alimentado se agregó por un período de 38 horas entre horas log 24 y 62. **74,365** lbs de glucosa se agregaron durante esta corrida. Se comenzó a enfriar el recipiente a 48°F en hora log 77. La cosecha empezó en 07-12-11 en hora log 82. Esta corrida fue limpia y secada por aspersión.

F2-6-11

#2011	Fecha de publicación	# Orden de producción	Recipiente/ # de corrida	Origen	Volumen del lote (Lt)	Volumen del Tanque Final (Lt)	Biomasa g/Lt	Volumen ajustado (g/L)	% de grasa
14	20110725	315181	F2-6-11	Semilla	120,000	131,000	57.19	62.43	73.55

(**SL-F2-6-11**) fue inoculado en 7-15-11 de (G1 en hora log 84). Esta corrida se loteó a 110,000 litros con medio basado en 120,000 litros. **1100** litros de medio de lote alimentado se agregó por un período de 37 horas entre horas log 25 y 62. **65,520** lbs de glucosa se agregaron durante esta corrida. Se comenzó a enfriar el recipiente a 48°F en hora log 67. La cosecha empezó en 07-18-11 en hora log 77. Esta corrida fue limpia y secada por aspersión.

Fig. 1 (cont.)

F2-8-11

#2011	Fecha de publicación	# Orden de producción	Recipiente/ # de corrida	Origen	Volumen del lote (Lt)	Volumen del Tanque Final (Lt)	Biomasa g/Lt	Volumen ajustado (g/L)	% de grasa
16	20110804	315665	F2-8-11	Semilla	120,000	126,400	56.51	59.52	70.86

(**SL-F2-6-11**) fue inoculado en 7-25-11 de (G1 en hora log 77).

1100 litros de medio de lote alimentado se agregó por un período de 30 horas entre horas log 24 y 54. **61,576** lbs de glucosa se agregaron durante esta corrida. Se comenzó a enfriar el recipiente a 48°F el 07-28-11 en hora log 61 debido a contaminación. La cosecha empezó en 07-28-11 en hora log. Esta corrida fue limpia y secada por aspersión.

F2-9-11

#2011	Fecha de publicación	# Orden de producción	Recipiente/ # de corrida	Origen	Volumen del lote (Lt)	Volumen del Tanque Final (Lt)	Biomasa g/Lt	Volumen ajustado (g/L)	% de grasa
18	20110811	315869	F2-9-11	Semilla	120,000	133,200	59.54	66.09	76.89

(**SL-F2-9-11**) fue inoculado en 8-03-11 de (G1A en hora log 89).

1200 litros de medio de lote alimentado se agregó por un período de 40 horas entre horas log 24 y 64. **74,300** lbs de glucosa se agregaron durante esta corrida. Se comenzó a enfriar el recipiente a 48°F el 08-06-11 en hora log 69. La cosecha empezó en hora log 79. Esta corrida fue limpia y secada por aspersión.

F2-10-11

#2011	Fecha de publicación	# Orden de producción	Recipiente/ # de corrida	Origen	Volumen del lote (Lt)	Volumen del Tanque Final (Lt)	Biomasa g/Lt	Volumen ajustado (g/L)	% de grasa
19	20110816	316416	F2-10-11	D/R	120,000	131,500	50.98	55.87	72.15

(**SL-F2-10-11**) fue inoculado en 8-08-11 de (G1 en hora log 769).

1200 litros de medio de lote alimentado se agregó por un período de 37 horas entre horas log 24 y 56. **70,906** lbs de glucosa se agregaron durante esta corrida. Se comenzó a enfriar el recipiente a 48°F en el 08-11-11 a hora log 72. La cosecha empezó en 08-21-11 en hora log 79. Esta corrida fue limpia y secada por aspersión.

Fig. 1 (cont.)

F1-8-11

#2011	Fecha de publicación	# Orden de producción	Recipiente/ # de corrida	Origen	Volumen del lote (Lt)	Volumen del Tanque Final (Lt)	Biomasa g/Lt	Volumen ajustado (g/L)	% de grasa
20	20110817	316266	F1-8-11	Semilla	80,000	87,000	70.40	76.56	76.31

(**SL-F1-8-11**) fue inoculado en 8-11-11 de (G1A en hora log 77).

800 litros de medio de lote alimentado se agregó por un período de 34 horas entre horas log 24 y 58. **50,544** lbs de glucosa se agregaron durante esta corrida. Se comenzó a enfriar el recipiente a 48°F el 08-11-11 en hora log 72. La cosecha empezó en 08-14-11 en hora log 89. Esta corrida fue limpia y secada por aspersión.

F2-11-11

#2011	Fecha de publicación	# Orden de producción	Recipiente/ # de corrida	Origen	Volumen del lote (Lt)	Volumen del Tanque Final (Lt)	Biomasa g/Lt	Volumen ajustado (g/L)	% de grasa
21	20110822	316379	F2-11-11	Semilla	120,000	129,400	57.39	61.89	73.64

(**SL-F2-11-11**) fue inoculado en 8-14-11 de (G1 en hora log 81).

1205.6 litros de medio de lote alimentado se agregó por un periodo de 35 horas entre horas log 24 y 59. **72,745** lbs de glucosa se agregaron durante esta corrida. Se comenzó a enfriar el recipiente a 48°F el 08-17-11 en hora log 72. La cosecha empezó en 08-18-11 en hora log 82. Esta corrida fue limpia y secada por aspersión.

F2-9-11

#2011	Fecha de publicación	# Orden de producción	Recipiente/ # de corrida	Origen	Volumen del lote (Lt)	Volumen del Tanque Final (Lt)	Biomasa g/Lt	Volumen ajustado (g/L)	% de grasa
22	20110823	316489	F1-9-11	Semilla	80,000	86,000	76.18	81.89	75.57

Fig. 1 (cont.)

(SL-F1-9-11) fue inoculado en 8-18-11 de (G1A en hora log 69).

804 litros de medio de lote alimentado se agregó por un período de 37 horas entre horas log 24 y 61. **46,555** lbs de glucosa se agregaron durante esta corrida. Se comenzó a enfriar el recipiente a 48°F el 08-21-11 en hora log 72. La cosecha empezó en 08-22-11 en hora log 84. Esta corrida fue limpia y secada por aspersión.

F2-13-11

#2011	Fecha de publicación	# Orden de producción	Recipiente/ # de corrida	Origen	Volumen del lote (Lt)	Volumen del Tanque Final (Lt)	Biomasa g/Lt	Volumen ajustado (g/L)	% de grasa
25	20110908	316981	SL F2-13-11	Semilla	120,000	124,100	55.64	57.54	70.95

(SL-F2-13-11) fue inoculado en 9-03-11 de (G1 en hora log 80).

1208.6 litros de medio de lote alimentado se agregó por un período de 34 horas. **59,864** lbs de glucosa se alimentaron durante esta corrida. Se comenzó a enfriar el recipiente a 48°F el 09-06-11 en hora log 70. La cosecha empezó en hora log 84.

F2-14-11

#2011	Fecha de publicación	# Orden de producción	Recipiente/ # de corrida	Origen	Volumen del lote (Lt)	Volumen del Tanque Final (Lt)	Biomasa g/Lt	Volumen ajustado (g/L)	% de grasa
28	20110920	317584	F2-14-11	Semilla	120,000	122,100	60.62	61.68	69.13

(SL-F2-14-11) fue inoculado en 9-12-11 de (G1A en hora log 77).

1207 litros de medio de lote alimentado se agregó por un período de 38 horas. **67,698** lbs de glucosa se agregaron durante esta corrida. Se comenzó a enfriar el recipiente a 48°F el 09-16-11 en hora log 76. La cosecha empezó en hora log 84.

- La desviación de temperatura se debió debido a una falla en el compresor de agua enfriada (la temperatura del recipiente alcanzó 91°F).
- Se perdió aire y se cerró el fermentador debido a una falla en el compresor de agua enfriada.

F1-13-11

#2011	Fecha de publicación	# Orden de producción	Recipiente/ # de corrida	Origen	Volumen del lote (Lt)	Volumen del Tanque Final (Lt)	Biomasa g/Lt	Volumen ajustado (g/L)	% de grasa
29	20110922	317681	F1-13-11	Semilla	80,000	81,300	60.89	61.88	67.56

Fig. 1 (cont.)

(SL-F1-13-11) fue inoculado en 9-16-11 de (G1 en hora log 81).

600 litros de medio de lote alimentado se agregó por un período de 34 horas **27,732** lbs de glucosa se agregaron durante esta corrida. Se comenzó a enfriar el recipiente a 48°F el 09-19-11 en hora log 65. La cosecha empezó en hora log 74.

- Problemas con la válvula de control de flujo del lote alimentado - Cambió brevemente el diafragma exponiendo al recipiente - No se detectó ninguna contaminación durante esta corrida. El recipiente de hora log 9 se calentó hasta 93 °F. Se cerró la válvula de agua fría debido al goteo de la válvula de control.

F1-14-11

#2011	Fecha de publicación	# Orden de producción	Recipiente/ # de corrida	Origen	Volumen del lote (Lt)	Volumen del Tanque Final (Lt)	Biomasa g/Lt	Volumen ajustado (g/L)	% de grasa
31	20110928	317961	F1-14-11	Semilla	80,000	91,000	86.88	98.83	68.57

(SL-F1-14-11) fue inoculado en 9-23-11 de (G1 en hora log 64).

800 litros de medio de lote alimentado se agregó por un período de 34 horas. **45,590** lbs de glucosa se agregaron durante esta corrida. Se comenzó a enfriar el recipiente a 48°F el 09-16-11 en hora log 70. La cosecha empezó en hora log 83.

F3-4-11

#2011	Fecha de publicación	# Orden de producción	Recipiente/ # de corrida	Origen	Volumen del lote (Lt)	Volumen del Tanque Final (Lt)	Biomasa g/Lt	Volumen ajustado (g/L)	% de grasa
32	20111003	318192	SL F3-4-11	Semilla	120,000	125,000	62.15	64.74	68.8

(SL-F3-4-11) fue inoculado en 9-27-11 de (G1A en hora log 90).

1205 litros de medio de lote alimentado se agregó por un período de 34 horas. **52,076** lbs de glucosa se agregaron durante esta corrida. Se comenzó a enfriar el recipiente a 48°F el 09-30-11 en hora log 70. La cosecha empezó en hora log 84.

- Se quedó sin espuma aproximadamente 4,500 lts a log 18.

F2-14-11

#2011	Fecha de publicación	# Orden de producción	Recipiente/ # de corrida	Origen	Volumen del lote (Lt)	Volumen del Tanque Final (Lt)	Biomasa g/Lt	Volumen ajustado (g/L)	% de grasa
34	20111010	318457	SL F1-15-11	Semilla	80,000	86,100	89.83	96.67	70.58

Fig. 1 (cont.)

(**SL-F1-15-11**) fue inoculado en 10-05-11 de (G1 en hora log 100).

800 litros de medio de lote alimentado se agregó por un periodo de 34 horas. **59,984** lbs de glucosa se agregaron durante esta corrida. Se comenzó a enfriar el recipiente a 48°F el 10-05-11 en hora log 70. La cosecha empezó en hora log 78.

- Medio modificado.
- Medio de lote alimentado modificado

F1-16-11

#2011	Fecha de publicación	# Orden de producción	Recipiente/ # de corrida	Origen	Volumen del lote (Lt)	Volumen del Tanque Final (Lt)	Biomasa g/Lt	Volumen ajustado (g/L)	% de grasa
36	20111017	318716	SL F1-16-11	Semilla	80,000	85,400	74.26	79.27	72.72

(**SL-F1-16-11**) fue inoculado en 10-10-11 de (G1 en hora log 84.5).

800 litros de medio de lote alimentado se agregó por un periodo de 34 horas. **39,851** lbs de glucosa se agregaron durante esta corrida. Se comenzó a enfriar el recipiente el 10-13-11 en hora log 70. La cosecha empezó en hora log 77.

- Medio modificado.
- Medio de lote alimentado modificado
- Medio de lote alimentado normal

F3-8-11

#2011	Fecha de publicación	# Orden de producción	Recipiente/ # de corrida	Origen	Volumen del lote (Lt)	Volumen del Tanque Final (Lt)	Biomasa g/Lt	Volumen ajustado (g/L)	% de grasa
46	20111111	319550	SL F3-8-11	Semilla	120,000	130,200	75.70	82.13	71.75

(**SL-F3-8-11**) fue inoculado en 11-03-11 de (G1 en hora log 94).

1200 litros de medio de lote alimentado se agregó por un periodo de 34 horas. **67,800** lbs de glucosa se agregaron durante esta corrida. Se comenzó a enfriar el recipiente a 48°F el 11-06-11 en hora log 75. La cosecha empezó en hora log 91.

Fig. 1 (cont.)

F5-5-11

#2011	Fecha de publicación	# Orden de producción	Recipiente/ # de corrida	Origen	Volumen del lote (Lt)	Volumen del Tanque Final (Lt)	Biomasa g/Lt	Volumen ajustado (g/L)	% de grasa
48	20111115	319771	SL F5-5-11	Semilla	220,000	233,500	69.81	74.11	68.7

(SL-F5-5-11) fue inoculado en 11-08-11 de (de SV3 en hora log 90).

2217 litros de medio de lote alimentado se agregó por un período de 34 horas. 45,836 lts de glucosa se agregaron durante esta corrida. Se comenzó a transferir el 50% de F4 a F2 y se comenzó a enfriar el recipiente a 48°F el 11-11-11 en hora log 78. La cosecha empezó a centrifugar de F2 en hora log 88.

F3-14-11

#2011	Fecha de publicación	# Orden de producción	Recipiente/ # de corrida	Origen	Volumen del lote (Lt)	Volumen del Tanque Final (Lt)	Biomasa g/Lt	Volumen ajustado (g/L)	% de grasa
63	20111222	321061	SL F3-14-11	Semilla	120,000	132,400	73.30	80.87	76.24

(SL-F3-14-11) fue inoculado en 12-16-11 de (G1 en hora log 106).

1202.7 litros de medio de lote alimentado se agregó por un período de 34 horas. 74,355 lbs de glucosa se agregaron durante esta corrida. Se comenzó a enfriar el recipiente a 48°F el 12-19-11 en hora log 72. La cosecha empezó en hora log 87.

- Ajuste de pH de cloruros con ácido cítrico antes de la filtración.

F1-25-11

#2011	Fecha de publicación	# Orden de producción	Recipiente/ # de corrida	Origen	Volumen del lote (Lt)	Volumen del Tanque Final (Lt)	Biomasa g/Lt	Volumen ajustado (g/L)	% de grasa
64	20111223	321102	SL F1-25-11	Semilla	80,000	83,000	82.59	85.69	74.8

(SL-F1-25-11) fue inoculado en 12-18-11 de (G1 en hora log 91).

797.7 litros de medio de lote alimentado se agregó por un período de 34 horas. 43,673 lbs de glucosa se agregaron durante esta corrida. Se comenzó a enfriar el recipiente a 48°F el 12-21-11 en hora log 68. La cosecha empezó en hora log 94.

- Ajuste de pH de cloruros antes de la filtración

Fig. 1 (cont.)

F3-15-11

#2011	Fecha de publicación	# Orden de producción	Recipiente/ # de corrida	Origen	Volumen del lote (Lt)	Volumen del Tanque Final (Lt)	Biomasa g/Lt	Volumen ajustado (g/L)	% de grasa
66	20111228	321150	SL F3-15-11	Semilla	120,000	131,000	71.15	77.67	75.8

(SL-F3-15-11) fue inoculado en 12-23-11 de (G1 en hora log 82).

1192.1 litros de medio de lote alimentado se agregó por un periodo de 34 horas. 76,953 lbs de glucosa se agregaron durante esta corrida. Se comenzó a enfriar el recipiente a 48°F el 12-26-11 en hora log 71. La cosecha empezó en hora log 85.

- Ajuste de pH de cloruros con ácido cítrico antes de la filtración

F1-1-12

#2011	Fecha de publicación	# Orden de producción	Recipiente/ # de corrida	Origen	Volumen del lote (Lt)	Volumen del Tanque Final (Lt)	Biomasa g/Lt	Volumen ajustado (g/L)	% de grasa
1	20120103	321175	SL F1-1-12	Semilla	80,000	83,600	76.18	79.61	70.24

(SL-F1-1-12) fue inoculado en 12-25-11 de (G1A en hora log 69).

806.4 litros de medio de lote alimentado se agregó por un periodo de 34 horas. 40,847 lbs de glucosa se agregaron durante esta corrida. Se comenzó a enfriar el recipiente a 48°F el 12-28-11 en hora log 73. La cosecha empezó en hora log 85.

- Ajuste de pH de cloruros antes de la filtración

F4-1-12

#2011	Fecha de publicación	# Orden de producción	Recipiente/ # de corrida	Origen	Volumen del lote (Lt)	Volumen del Tanque Final (Lt)	Biomasa g/Lt	Volumen ajustado (g/L)	% de grasa
5	20120116	400538.1	SL F4-1-12	Semilla	220,000	231,400	68.69	72.25	68.53

(SL-F4-1-12) fue inoculado en 1-09-12 de (de SV3 en hora log).

2220.2 litros de medio de lote alimentado se agregó por un periodo de 32 horas. 42,343 lts de glucosa se agregaron durante esta corrida. Se comenzó a enfriar el recipiente a 48°F el 1-12-12 en hora log 74 y enviando la mitad a F2 para asistir al enfriamiento. Se comenzó la centrifugación en hora log 79 a partir de F4 primero.

Fig. 1 (cont.)

F6-2-12

#2011	Fecha de publicación	# Orden de producción	Recipiente/ # de corrida	Origen	Volumen del lote (Lt)	Volumen del Tanque Final (Lt)	Biomasa g/Lt	Volumen ajustado (g/L)	% de grasa
6	20120120	400684.1	SL F6-2-12	Semilla	216,000	237,200	76.27	83.76	69.13

(**SL-F6-2-12**) fue inoculado en 1-12-12 de (de SV3 en hora log 43). **2223.4** litros de medio de lote alimentado se agregó por un período de 32 horas. **57,288** litros de glucosa se agregaron durante esta corrida. Se comenzó a enfriar el recipiente a 48°F el 1-15-12 en hora log 85 y se envió la mitad a F2 para ayudar al enfriamiento. La centrifugación empezó en hora log 89 a partir de F6 primero.

F5-2-12

#2011	Fecha de publicación	# Orden de producción	Recipiente/ # de corrida	Origen	Volumen del lote (Lt)	Volumen del Tanque Final (Lt)	Biomasa g/Lt	Volumen ajustado (g/L)	% de grasa
7	20120126	400940.1	SL F5-2-12	Semilla	224,000	241,120	76.62	82.48	75

(**SL-F5-2-12**) fue inoculado en 1-16-12 de (a partir de **SL-F6-2-12** en hora log 85). **2218.7** litros de medio de lote alimentado se agregó por un período de 32 horas. **55,998** lts de glucosa se agregaron durante esta corrida. Se comenzó a enfriar el recipiente a 48°F el 1-20-12 en hora log 97 y se envió la mitad a F2 para ayudar al enfriamiento. La centrifugación empezó en hora log 117 a partir de F5 primero.

F4-2-12

#2011	Fecha de publicación	# Orden de producción	Recipiente/ # de corrida	Origen	Volumen del lote (Lt)	Volumen del Tanque Final (Lt)	Biomasa g/Lt	Volumen ajustado (g/L)	% de grasa
8	20120130	401149.1	SL F4-2-12	Semilla	220,000	231,000	65.54	68.82	69.1

(**SL-F4-2-12**) fue inoculado en 1-20-12 de (SV-3 en hora log 47). **2215.4** litros de medio de lote alimentado se agregó por un período de 32 horas. **40,744** lts de glucosa se agregaron durante esta corrida. Se comenzó a enfriar el recipiente a 48°F el 1-23-12 en hora log 73. La cosecha empezó en hora log **161**.

Fig. 1 (cont.)

- La cosecha se retrasó debido a problemas del secado por aspersión

F6-3-12

#2011	Fecha de publicación	# Orden de producción	Recipiente/ # de corrida	Origen	Volumen del lote (Lt)	Volumen del Tanque Final (Lt)	Biomasa g/Lt	Volumen ajustado (g/L)	% de grasa
9	20120209	401534.1	SL F6-3-12	Semilla	220,000	229,720	56.16	58.64	69.34

(SL-F6-3-12) fue inoculado en 2-01-12 de (SV3 en hora log 46).

2215.6 litros de medio de lote alimentado se agregó por un período de 32 horas. 35,494 lts de glucosa se agregaron durante esta corrida. Se comenzó a enfriar y cosechar el 2-04-12 en hora log 78. La cosecha se envió directo a las centrifugas en hora log 94 y no se uso F2 como el tanque de cosecha.

- La temperatura se excursión en log hora 13 a 21 debido al control de temperatura en modo ROUT y no en modo RCAS. La modificaciones se realizaron para el procedimiento para asegurar que el control de temperatura se colocara en modo RCAS cuando el loteo empiece.

F5-3-12

#2011	Fecha de publicación	# Orden de producción	Recipiente/ # de corrida	Origen	Volumen del lote (Lt)	Volumen del Tanque Final (Lt)	Biomasa g/Lt	Volumen ajustado (g/L)	% de grasa
10	20120215	401824.1	SL F5-3-12	Semilla	220,000	224,300	59.62	60.79	67.28

(SL-F5-3-12) fue inoculado en 2-07-12 de (SV3 en hora log 46).

2214.9 litros de medio de lote alimentado se agregó por un período de 32 horas. 36,746 lts de glucosa se agregaron durante esta corrida. Se comenzó a enfriar y cosechar el 2-11-12 en hora log 93. La cosecha se envió directo a las centrifugas y no se uso F2 como el tanque de cosecha.

F1-2-12

#2011	Fecha de publicación	# Orden de producción	Recipiente/ # de corrida	Origen	Volumen del lote (Lt)	Volumen del Tanque Final (Lt)	Biomasa g/Lt	Volumen ajustado (g/L)	% de grasa
11	20120229	402398.1	SL F1-2-12	Semilla	80,000	83,600	89.65	93.68	71.09

Fig. 1 (cont.)

(**SL-F1-2-12**) fue inoculado en 2-22-12 de (G1 en hora log 54).
797.9 litros de medio de lote alimentado se agregó por un período de 32 horas.
48,871 lbs de glucosa se agregaron durante esta corrida. Se comenzó a enfriar el recipiente a 48°F el 12-28-11 en hora log 72. La cosecha empezó en hora log 81.

F1-4-12

#2011	Fecha de publicación	# Orden de producción	Recipiente/ # de corrida	Origen	Volumen del lote (Lt)	Volumen del Tanque Final (Lt)	Biomasa g/Lt	Volumen ajustado (g/L)	% de grasa
28	20120328	403430.1	SL F1-4-12	Semilla	80,000	89,200	90.29	100.67	68.42

(**SL-F1-4-12**) fue inoculado en 3-22-12 de (G1 en hora log 71).
803.6 litros de medio de lote alimentado se agregó por un período de 34 horas.
59,067 lbs de glucosa se agregaron durante esta corrida. Se comenzó a enfriar el recipiente a 48°F el 3-25-12 en hora log 72. La cosecha empezó en hora log 83.

F3-4-12

#2011	Fecha de publicación	# Orden de producción	Recipiente/ # de corrida	Origen	Volumen del lote (Lt)	Volumen del Tanque Final (Lt)	Biomasa g/Lt	Volumen ajustado (g/L)	% de grasa
27	20120501	404568.1	SL F3-4-12	Semilla	120,000	129,200	85.00	91.52	70.93

(**SL-F3-4-12**) fue inoculado en 4-25-12 de (G1 en hora log 67).
1193.8 litros de medio de lote alimentado se agregó por un período de 34 horas.
92,224 lbs de glucosa se agregaron durante esta corrida. Se comenzó a enfriar el recipiente a 48°F el 4-28-12 en hora log 72. La cosecha empezó en hora log 89.

F6-7-12

#2011	Fecha de publicación	# Orden de producción	Recipiente/ # de corrida	Origen	Volumen del lote (Lt)	Volumen del Tanque Final (Lt)	Biomasa g/Lt	Volumen ajustado (g/L)	% de grasa
28	20120507	404695.1	SL F6-7-12	Semilla	220,000	241,580	73.37	80.57	70.95

(**SL-F6-7-12**) fue inoculado en 4-27-12 de (SV-3 en hora log 77).
2217.2 litros de medio de lote alimentado se agregó por un período de 34 horas.
53,951 lbs de glucosa se agregaron durante esta corrida. Se comenzó a enfriar el recipiente a 48°F el 4-30-12 en hora log 81. La cosecha empezó en hora log 108.

Fig. 1 (cont.)

F1-8-12

#2011	Fecha de publicación	# Orden de producción	Recipiente/ # de corrida	Origen	Volumen del lote (Lt)	Volumen del Tanque Final (Lt)	Biomasa g/Lt	Volumen ajustado (g/L)	% de grasa
29	20120508	404849.1	SL F1-8-12	Semilla	80,000	89,300	89.04	99.39	72.08

(**SL-F1-8-12**) fue inoculado en 4-30-12 de (G1A en hora log 74).

795.5 litros de medio de lote alimentado se agregó por un período de 34 horas. 53,393 lbs de glucosa se agregaron durante esta corrida. Se comenzó a enfriar el recipiente a 48°F el 5-03-12 en hora log 72. La cosecha empezó en hora log 122.

- La corrida usó antiespumantes ESP FC 131. Pareció trabajar bien en F1.
- Los problemas ocurrieron en el secado por aspersión. El producto estuvo muy pegajoso y no fluía bien. 260 kg de aceite se perdió en el sobreflujo tamizado. El producto del sobreflujo tamizado no pudo recuperarse. El secador también generó un producto aceitoso.

F3-6-12

#2011	Fecha de publicación	# Orden de producción	Recipiente/ # de corrida	Origen	Volumen del lote (Lt)	Volumen del Tanque Final (Lt)	Biomasa g/Lt	Volumen ajustado (g/L)	% de grasa
31	20120525	405450.1	SL F3-6-12	Semilla	120,000	123,800	74.09	76.44	72.15

(**SL-F3-6-12**) fue inoculado en 5-18-12 de (G1A en hora log 89).

1201.5 litros de medio de lote alimentado se agregó por un período de 34 horas. 78,211 lbs de glucosa se agregaron durante esta corrida. Se comenzó a enfriar el recipiente a 48°F el 5-21-12 en hora log 72. La cosecha empezó en hora log 84.

- Utilizando antiespumante ESP FC 131.

F3-7-12

#2011	Fecha de publicación	# Orden de producción	Recipiente/ # de corrida	Origen	Volumen del lote (Lt)	Volumen del Tanque Final (Lt)	Biomasa g/Lt	Volumen ajustado (g/L)	% de grasa
32	20120531	405587.1	SL F3-7-12	Semilla	120,000	126,800	78.12	82.55	69.63

(**SL-F3-7-12**) fue inoculado en 5-24-12 de (G1A en hora log 72).

1197 litros de medio de lote alimentado se agregó por un período de 34 horas. 80,494 lbs de glucosa se agregaron durante esta corrida. Se comenzó a enfriar el recipiente a 48°F el 5-21-12 en hora log 72. La cosecha empezó en hora log 83.

Fig. 1 (cont.)

- Usando antiespumante ESP FC 131.
- Se agotó la espuma en log hora 15 a 16. Se perdió aproximadamente 2,000 lts.
- Se perdió una cantidad desconocida durante la cosecha debido al puerto de muestra CT-2 que se dejó abierto. NCR lo emitió.
-

F3-8-12

#2011	Fecha de publicación	# Orden de producción	Recipiente/ # de corrida	Origen	Volumen del lote (Lt)	Volumen del Tanque Final (Lt)	Biomasa g/Lt	Volumen ajustado (g/L)	% de grasa
33	20120605	405739.1	SL F3-8-12	Semilla	120,000	126,900	66.06	69.86	71.77

(**SL-F3-8-12**) fue inoculado en 6-05-12 de (G1 en hora log 73).

1199.5 litros de medio de lote alimentado se agregó por un período de 34 horas. **87,424** lbs de glucosa se agregaron durante esta corrida. Se comenzó a enfriar el recipiente a 48°F el 6-05-12 en hora log 72. La cosecha empezó en hora log 86.

Fig. 1 (cont.)

a) **F1-2-11**

F1-2-11	
PERFIL DE ÁCIDO GRASO	
PRUEBA	RESULTADOS
C 06:0 (Acido caprónico)	<0.10%
C 07:0 (Acido heptanónico)	<0.10%
C 08:0 (Acido caprílico)	<0.10%
C 09:0 (Acido nonanónico)	<0.10%
C 10:0 (Acido cáprico)	<0.10%
C 11:0 (Acido undecanónico)	<0.10%
C 12:0 (Acido láurico)	<0.10%
C 13:0 (Acido tridecanónico)	<0.10%
C 14:0 (Acido mirístico)	4.01%
C 14:1 (Acido miristoléico)	1.35%
C 15:0 (Acido pentadecanónico)	<0.10%
C 15:1 (Acido pentadecenónico)	<0.10%
C 16:0 (Acido palmítico)	54.42%
C 16:1 (Acido palmitoléico)	<0.10%
C 17:0 (Acido margárico)	0.51%
C 17:1 (Acido margaroléico)	<0.10%
C 18:0 (Acido esteárico)	1.81%
C 18:1n7 (Acido vaccénico)	<0.10%
C 18:1n9 (Acido oleico)	<0.10%
C 18:1n9t (Acido elaídico)	<0.10%
C 18:2n6 (Acido linoléico)	<0.10%
C 18:2n6t (Acido linolelaídico)	<0.10%
C 18:3n3 (Acido alfa-linolénico)	<0.10%
C 18:3n6 (Acido gama-linolénico)	<0.10%
C 19:0 (Acido nonadecanónico)	<0.10%
C 20:0 (Acido araquídico)	0.31%
C 20:1 (Acido eciosenónico)	<0.10%
C 20:2n6 (Acido eicosadienónico)	<0.10%
C 20:3n3 (Acido eicosatrienónico)	<0.10%
C 20:3n6 (Acido homo-gama-linolénico)	<0.10%
C 20:4n6 (Acido araquidónico)	<0.10%
C 20:5n3 (Acido eicosapentaenónico)	0.37%
C 21:0 (Acido heneicosanónico)	<0.10%
C 22:0 (Acido behénico)	0.18%
C 22:1 (Acido erúcico)	0.63%
C 22:2n6 (Acido docosadienónico)	0.45%

Fig. 2

C 22:5n3 (Acido docosapentaenónico)	<0.10%
C 22:6n3 (Acido docosaheptaenónico)	27.22%
C 23:0 (Acido tricosanónico)	<0.10%
C 24:0 (Acido lignocérico)	<0.10%
C 24:1 (Acido nervónico)	<0.10%
Componentes desconocidos	0.95%

b) **F1-9-11**

F1-9-11	
PERFIL DE ÁCIDO GRASO	
PRUEBA	RESULTADOS
C 06:0 (Acido caprónico)	<0.10%
C 07:0 (Acido heptanónico)	<0.10%
C 08:0 (Acido caprílico)	<0.10%
C 09:0 (Acido nonanónico)	<0.10%
C 10:0 (Acido cáprico)	<0.10%
C 11:0 (Acido undecanónico)	<0.10%
C 12:0 (Acido láurico)	<0.10%
C 13:0 (Acido tridecanónico)	<0.10%
C 14:0 (Acido mirístico)	4.15%
C 14:1 (Acido miristoléico)	1.51%
C 15:0 (Acido pentadecanónico)	<0.10%
C 15:1 (Acido pentadecenónico)	<0.10%
C 16:0 (Acido palmítico)	55.50%
C 16:1 (Acido palmitoléico)	<0.10%
C 17:0 (Acido margárico)	0.53%
C 17:1 (Acido margaroléico)	<0.10%
C 18:0 (Acido esteárico)	1.77%
C 18:1n7 (Acido vaccénico)	<0.10%
C 18:1n9 (Acido oleico)	<0.10%
C 18:1n9t (Acido elaídico)	<0.10%
C 18:2n6 (Acido linoléico)	<0.10%
C 18:2n6t (Acido linoleláidico)	<0.10%
C 18:3n3 (Acido alfa-linolénico)	<0.10%
C 18:3n6 (Acido gama-linolénico)	<0.10%
C 19:0 (Acido nonadecanónico)	<0.10%
C 20:0 (Acido araquídico)	0.30%
C 20:1 (Acido eciosenónico)	<0.10%
C 20:2n6 (Acido eicosadienónico)	<0.10%
C 20:3n3 (Acido eicosatrienónico)	<0.10%
C 20:3n6 (Acido homo-gama-linolénico)	<0.10%

Fig. 2 (cont.)

C 20:4n6 (Acido araquidónico)	<0.10%
C 20:5n3 (Acido eicosapentaenónico)	0.13%
C 21:0 (Acido heneicosanónico)	<0.10%
C 22:0 (Acido behénico)	<0.10%
C 22:1 (Acido erúcico)	0.58%
C 22:2n6 (Acido docosadienónico)	0.43%
C 22:5n3 (Acido docosapentaenónico)	<0.10%
C 22:6n3 (Acido docosaheptaenónico)	27.03%
C 23:0 (Acido tricosanónico)	<0.10%
C 24:0 (Acido lignocérico)	<0.10%
C 24:1 (Acido nervónico)	<0.10%
Componentes desconocidos	0.57%

c) **F1-5-11**

F1-5-11	
PERFIL DE ÁCIDO GRASO	
PRUEBA	RESULTADOS
C 06:0 (Acido capríco)	<0.10%
C 07:0 (Acido heptanónico)	<0.10%
C 08:0 (Acido caprílico)	<0.10%
C 09:0 (Acido nonanónico)	<0.10%
C 10:0 (Acido cáprico)	<0.10%
C 11:0 (Acido undecanónico)	<0.10%
C 12:0 (Acido láurico)	<0.10%
C 13:0 (Acido tridecanónico)	<0.10%
C 14:0 (Acido mirístico)	3.42%
C 14:1 (Acido miristoléico)	1.92%
C 15:0 (Acido pentadecanónico)	<0.10%
C 15:1 (Acido pentadecenónico)	<0.10%
C 16:0 (Acido palmítico)	54.15%
C 16:1 (Acido palmitoléico)	<0.10%
C 17:0 (Acido margárico)	0.85%
C 17:1 (Acido margaroléico)	<0.10%
C 18:0 (Acido esteárico)	1.80%
C 18:1n7 (Acido vaccénico)	<0.10%
C 18:1n9 (Acido oleico)	<0.10%
C 18:1n9t (Acido elaídico)	<0.10%
C 18:2n6 (Acido linoléico)	<0.10%
C 18:2n6t (Acido linolelaídico)	<0.10%
C 18:3n3 (Acido alfa-linolénico)	<0.10%
C 18:3n6 (Acido gama-linolénico)	<0.10%

Fig. 2 (cont.)

C 19:0 (Acido nonadecanóico)	<0.10%
C 20:0 (Acido araquídico)	0.23%
C 20:1 (Acido eciosenóico)	<0.10%
C 20:2n6 (Acido eicosadienóico)	<0.10%
C 20:3n3 (Acido eicosatrienóico)	<0.10%
C 20:3n6 (Acido homo-gama-linolénico)	<0.10%
C 20:4n6 (Acido araquidónico)	<0.10%
C 20:5n3 (Acido eicosapentaenóico)	0.33%
C 21:0 (Acido heneicosanóico)	<0.10%
C 22:0 (Acido behénico)	<0.10%
C 22:1 (Acido erúcico)	0.38%
C 22:2n6 (Acido docosadienóico)	0.42%
C 22:5n3 (Acido docosapentaenóico)	<0.10%
C 22:6n3 (Acido docosaheptaenóico)	27.34%
C 23:0 (Acido tricosanóico)	<0.10%
C 24:0 (Acido lignocérico)	<0.10%
C 24:1 (Acido nervónico)	<0.10%
Componentes desconocidos	0.62%

d) **F1-14-11**

F1-14-11	
PERFIL DE ÁCIDO GRASO	
PRUEBA	RESULTADOS
C 06:0 (Acido capróico)	<0.10%
C 07:0 (Acido heptanóico)	<0.10%
C 08:0 (Acido caprílico)	<0.10%
C 09:0 (Acido nonanóico)	<0.10%
C 10:0 (Acido cáprico)	<0.10%
C 11:0 (Acido undecanóico)	<0.10%
C 12:0 (Acido láurico)	0.17%
C 13:0 (Acido tridecanóico)	<0.10%
C 14:0 (Acido mirístico)	4.57%
C 14:1 (Acido miristoléico)	<0.10%
C 15:0 (Acido pentadecanóico)	1.44%
C 15:1 (Acido pentadecenóico)	<0.10%
C 16:0 (Acido palmítico)	53.49%
C 16:1 (Acido palmitoléico)	0.14%
C 17:0 (Acido margárico)	0.45%
C 17:1 (Acido margaroléico)	<0.10%
C 18:0 (Acido esteárico)	1.67%
C 18:1n7 (Acido vaccénico)	<0.10%

Fig. 2 (cont.)

C 18:1n9 (Acido oleico)	0.11%
C 18:1n9t (Acido elaídico)	<0.10%
C 18:2n6 (Acido linoléico)	<0.10%
C 18:2n6t (Acido linoleláidico)	<0.10%
C 18:3n3 (Acido alfa-linolénico)	<0.10%
C 18:3n6 (Acido gama-linolénico)	<0.10%
C 19:0 (Acido nonadecanónico)	<0.10%
C 20:0 (Acido araquídico)	0.31%
C 20:1 (Acido eciosenónico)	<0.10%
C 20:2n6 (Acido eicosadienónico)	<0.10%
C 20:3n3 (Acido eicosatrienónico)	<0.10%
C 20:3n6 (Acido homo-gama-linolénico)	0.15%
C 20:4n6 (Acido araquidónico)	0.86%
C 20:5n3 (Acido eicosapentaenónico)	0.31%
C 21:0 (Acido heneicosanónico)	<0.10%
C 22:0 (Acido behénico)	0.17%
C 22:1 (Acido erúcico)	<0.10%
C 22:2n6 (Acido docosadienónico)	<0.10%
C 22:5n3 (Acido docosapentaenónico)	<0.10%
C 22:6n3 (Acido docosaheptaenónico)	27.33%
C 23:0 (Acido tricosanónico)	<0.10%
C 24:0 (Acido lignocérico)	0.14%
C 24:1 (Acido nervónico)	0.22%
Componentes desconocidos	1.42%

d) **F1-14-11**

F1-14-11	
PERFIL DE ÁCIDO GRASO	
PRUEBA	RESULTADOS
C 06:0 (Acido caprónico)	<0.10%
C 07:0 (Acido heptanónico)	<0.10%
C 08:0 (Acido caprílico)	<0.10%
C 09:0 (Acido nonanónico)	<0.10%
C 10:0 (Acido cáprico)	<0.10%
C 11:0 (Acido undecanónico)	<0.10%
C 12:0 (Acido láurico)	0.16%
C 13:0 (Acido tridecanónico)	<0.10%
C 14:0 (Acido mirístico)	4.43%
C 14:1 (Acido miristoléico)	0.18%
C 15:0 (Acido pentadecanónico)	1.17%
C 15:1 (Acido pentadecenónico)	<0.10%

Fig. 2 (cont.)

C 16:0 (Acido palmítico)	55.87%
C 16:1 (Acido palmitoléico)	0.13%
C 17:0 (Acido margárico)	0.40%
C 17:1 (Acido margaroléico)	<0.10%
C 18:0 (Acido esteárico)	1.62%
C 18:1n7 (Acido vaccénico)	<0.10%
C 18:1n9 (Acido oleico)	<0.10%
C 18:1n9t (Acido elaídico)	<0.10%
C 18:2n6 (Acido linoléico)	<0.10%
C 18:2n6t (Acido linoleláidico)	<0.10%
C 18:3n3 (Acido alfa-linolénico)	<0.10%
C 18:3n6 (Acido gama-linolénico)	<0.10%
C 19:0 (Acido nonadecanóico)	<0.10%
C 20:0 (Acido araquídico)	0.28%
C 20:1 (Acido eciosenóico)	<0.10%
C 20:2n6 (Acido eicosadienóico)	<0.10%
C 20:3n3 (Acido eicosatrienóico)	0.90%
C 20:3n6 (Acido homo-gama-linolénico)	0.13%
C 20:4n6 (Acido araquidónico)	<0.10%
C 20:5n3 (Acido eicosapentaenóico)	0.29%
C 21:0 (Acido heneicosanóico)	<0.10%
C 22:0 (Acido behénico)	0.15%
C 22:1 (Acido erúcico)	<0.10%
C 22:2n6 (Acido docosadienóico)	0.43%
C 22:5n3 (Acido docosapentaenóico)	<0.10%
C 22:6n3 (Acido docosaheptaenóico)	26.92%
C 23:0 (Acido tricosanóico)	<0.10%
C 24:0 (Acido lignocérico)	<0.10%
C 24:1 (Acido nervónico)	0.22%
Componentes desconocidos	0.65%

Fig. 2 (cont.)

LABORATORIOS DE ASEGURAMIENTO DE CALIDAD DE ALLTECH

Perfil Típico de Ácidos Grasos de Alimento ALGAE-S

Ácido Graso	Contenido de Grasa en %
Acido capróico	<0.10%
Acido heptanóico	<0.10%
Acido caprílico	<0.10%
Acido nonanóico	<0.10%
Acido cáprico	<0.10%
Acido undecanóico	<0.10%
Acido láurico	<0.10%
Acido tridecanóico	<0.10%
Acido mirístico	3.86%
Acido miristoléico	1.60%
Acido pentadecanóico	<0.10%
Acido palmítico	54.69%
Acido palmitoléico	<0.10%
Acido margárico	0.63%
Acido margaroléico	<0.10%
Acido esteárico	1.80%
Acido vaccénico	<0.10%
Acido oleico	<0.10%
Acido elaídico	<0.10%
Acido linoléico	<0.10%
Acido linoleláidico	<0.10%
Acido alfa-linolénico	<0.10%
Acido gama-linolénico	<0.10%
Acido nonadecanóico	<0.10%
Acido araquídico	0.28%
Acido eicosenóico	<0.10%
Acido eicosadienóico	<0.10%
Acido eicosatrienóico	<0.10%
Acido homo-gama-linolénico	<0.10%
Acido araquidónico	<0.10%
Acido eicosapentaenóico	0.28%
Acido heneicosanóico	<0.10%
Acido behénico	<0.10%
Acido erúcico	0.53%
Acido docosadienóico	0.43%
Acido docosapentaenóico	<0.10%
Acido docosahexaenóico	27.20%
Acido tricosanóico	<0.10%
Acido lignocérico	<0.10%
Acido nervónico	<0.10%
Desconocidos	0.71%

Fig. 3