

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 572 833**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/64** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2007 E 07873362 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016 EP 2082053**

54 Título: **Proceso de producción de aceite microbiano que contiene ácidos grasos poliinsaturados**

30 Prioridad:

**01.08.2006 US 821084 P**

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

**02.06.2016**

73 Titular/es:

**DSM NUTRITIONAL PRODUCTS AG (100.0%)  
Wurmisweg 576  
4303 Kaiseraugst, CH**

72 Inventor/es:

**RDIANINGTYAS, HELIA;  
BURJA, ADAM M. y  
BARROW, COLIN JAMES**

74 Agente/Representante:

**ZEA CHECA, Bernabé**

**ES 2 572 833 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Proceso de producción de aceite microbiano que contiene ácidos grasos poliinsaturados

## 5 I. Antecedentes

[0001] Existen pruebas científicas abrumadoras de que algunos ácidos grasos altamente insaturados (n-3) tales como el ácido docosahexaenoico (DHA) tienen un efecto positivo en enfermedades cardiocirculatorias, inflamaciones crónicas y trastornos cerebrales, aunque también se ha observado que el ácido eicosapentaenoico, también un ácido graso n-3, realiza funciones como un metabolito intermedio dentro de los esteroides de eicosanoides, tales como prostaglandinas, leucotrienos o similares.

[0002] En la actualidad, la principal fuente de estos ácidos grasos altamente insaturados es el pescado, con EPA y DHA observado en el pescado azul (tales como sardinas y atún) en cantidades de aproximadamente un 20 % y un 10 %, respectivamente. Se cree que un perfil de este tipo de ácidos grasos se produce a través de la selección natural de las proporciones óptimas para un rendimiento óptimo dentro de cada especie de pescados. Sin embargo, si se pretende usar aceite de pescado como única fuente de estos lípidos, existen varias desventajas, tales como problemas con contaminación del sabor, fluctuaciones incontrolables en la disponibilidad y la variabilidad del contenido en el aceite de pescado natural. Además, si se pretende obtener un aceite (n-3) o (n-6) altamente purificado a partir de estas fuentes, es muy difícil separarlo y purificar lo preferentemente.

[0003] La presente invención proporciona un método para preparar una composición lipídica, método que comprende:

25 cultivar un microbio productor de aceite/microbio productor de aceite en un medio heterótrofo que comprende un antagonista de producción de ácido graso,

en el que el microbio productor de aceite/microbio productor de aceite tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene una identidad de al menos un 97 % con la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1,

30 y en el que el antagonista de producción de ácido graso es el ácido oleico.

## II. Sumario

35 [0004] Se desvelan composiciones y métodos relacionados con un eucariota del orden Thraustochytriales y la familia Thraustochytriaceae que, cuando se cultivan, producen cantidades de ácidos grasos insaturados, tales como aceites omega 3 (n-3) y/o omega 6 (n-6), tales como DHA, EPA y DPA, capaces de ser purificados y usados ya que todas las composiciones de este tipo se usan y más, debido a sus medios de producción.

40 [0005] Se desvelan composiciones y métodos relacionados con microbios que producen aceite, que, cuando se cultivan, producen cantidades de ácidos grasos insaturados, tales como aceites omega 3 (n-3) y/o omega 6 (n-6), tales como DHA, EPA y DPA, capaces de ser purificados y usados ya que todas las composiciones de este tipo se usan y más, debido a sus medios de producción.

45 [0006] También se desvelan métodos para modificar dichas concentraciones de ácido graso dentro de las composiciones lipídicas total usando antagonistas de producción de ácido graso que inhiben o estimulan ciertos componentes de la ruta de producción clásica de ácidos grasos que se cree que existe dentro de microbios que producen aceite.

## 50 III. Breve descripción de las figuras

[0007] Las figuras adjuntas ilustran varias realizaciones y junto con la descripción ilustran las composiciones y métodos desvelados.

55 La Figura 1 muestra la ruta metabólica propuesta para la producción de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) para los microbios que producen los aceites desvelados.

La Figura 2 muestra el perfil de ácido graso de ONC-T18 cultivado en medio que contiene 2 g l<sup>-1</sup> de extracto de levadura, 8 g l<sup>-1</sup> de L-glutamato, 6 g l<sup>-1</sup> de sal marina y 60 g l<sup>-1</sup> de glucosa en 3 tipos diferentes de fermentación: placa de agar (agar al 1,5 %, 25 °C, 27 días), Matraces (50 ml en matraz de 250 ml, 120 RPM, 25 °C, 3 días) y biorreactor de 5 l (4 l pm de aire, pO<sub>2</sub> al 90 %, 25 °C, 3 días).

La Figura 3 muestran biomasa, ácido graso total (TFA), producción de DHA y uso de glucosa habituales de *Thraustochytrium* sp. La cepa ONC-T18 mantenido en un biorreactor de 5 l durante 168 h con medio formado por 60 g l<sup>-1</sup> de glucosa, 2 g l<sup>-1</sup> de extracto de levadura, 8 g l<sup>-1</sup> de ácido glutámico y 6 g l<sup>-1</sup> de sal (4 l pm de aire, pO<sub>2</sub> al 90 %, 25 °C, pH 7-9).

65 La Figura 4 muestra la relación evolutiva de *Thraustochytrium* sp. La cepa ONC-T18 basado en el gen del ARNr

de 18S con respecto a varios Thraustochytridae de origen japonés (CHN-1 de *Thraustochytrium*, MBIC 11093 de Thraustochytridae y N1-27 de Thraustochytridae) y una cepa T91-6 de *T. striatum*.

La Figura 5 muestra que ONC-T18 se cultivó en diversas fuentes de Nitrógeno, por ejemplo extracto de levadura con diversas calidades, L-glutamato, agua de macerado de maíz, etc. El L-glutamato solo no fomentaba la producción de biomasa, ácido graso total (TFA) o de DHA. Sin embargo, en presencia de L-glutamato, diversas fuentes de N, incluyendo extracto de levadura y agua de macerado de maíz, proporcionaba mejores resultados que sin L-glutamato. (Relacionado con el ejemplo 11 de la Tabla 7).

La Figura 6 muestra que ONC-T18 se cultivó en diversas fuentes de Carbono, y monosacáridos tales como glucosa etc., sacarosa y molasas proporcionaban biomasa, TFA y DHA elevados. (Relacionado con las Tablas 6 y 7).

La Figura 7 muestra que antioxidante, fitohormonas o acetato sódico (carbono simple) solubles en agua no aumentaban los resultados de biomasa, TFA o DHA en comparación con el medio convencional solo.

La Figura 8 muestra la diferencia entre la fermentación de ONC-T18 a 18 °C y 25 °C. La temperatura más baja (es decir, 18 °C) daba como resultado una absorción de glucosa significativamente más elevada, la mitad del TFA y biomasa comparable y niveles de DHA que los del cultivo de control. Por lo tanto, se encontró que la fermentación a 25 °C era más eficaz que a 18 °C.

La Figura 9 muestra que ONC-T18 se alimentó con ácido oleico puro. El perfil de ácido graso de ONC-T18 (alimentado con ácido oleico puro) mostraba que la mayor parte del ácido oleico se convertía en DHA, con un nivel elevado de EPA en comparación con ONC-T18 alimentado con glucosa.

La Figura 10 muestra los efectos del ácido toluico en la composición de ácido graso de ONC-T18. El perfil de ácido graso de ONC-T18 (alimentado con 0,2 g/l de ácido toluico) mostraba que el compuesto era capaz de aumentar la proporción de EPA dentro del perfil aunque disminuyendo la proporción de DPA (n6). Los valores son la media de cuatro experimentos que comparan 0,2 g/l de ácido toluico con respecto a un control.

La Figura 11 muestra los resultados de cromatografía de gases del cultivo de ONC-T18 con ejemplos de antagonistas de producción de ácido graso.

La Figura 12 muestra el efecto de la adición de Norflurazón a perfil de ácido graso de ONC-T18. La Figura 12 muestra que la proporción de PUFA aumentaba a medida que aumentaba la cantidad de Norflurazón añadido.

La Figura 13 muestra que cuando ONC-T18 se exponía al Norflurazón, el contenido de carotenoide disminuía, en paralelo con un aumento de DHA.

La Figura 14 muestra que cuando el ácido oleico se añadía en el medio de ONC-T18, se observaba más contenido de DHA, especialmente cuando se asociará con el crecimiento (indicado por la presencia de alto contenido de N y bajo contenido de N).

La Figura 15 muestra que cuando se añadía cerulenina al medio de ONC-T18, aunque no se observaba un cambio en el % de cada ácido graso con respecto al contenido de ácido graso total, cuando se tenían en cuenta concentraciones de ácido graso total con respecto a biomasa (mg/g), se observaban aumentos tanto en C16:0 como en DHA.

#### IV. Descripción detallada

[0008] Antes de divulgar y describir los presentes compuestos, composiciones, artículos, dispositivos, y/o métodos, se debe entender que no están limitados a métodos de síntesis específicos o métodos de biotecnología específicos a menos que se indique de otro modo, o a reactivos en particular a menos que se indique de otro modo, y como tal, supuesto, pueden variar. También se debe entender que la terminología usada en el presente documento es con la finalidad de describir solamente realizaciones en particular.

[0009] Los expertos en la materia reconocerán, o serán capaces de determinar el uso no que de experimentación de rutina, muchos equivalentes para las realizaciones específicas del método y composiciones descritos en el presente documento.

#### 50 A. Definiciones

[0010] La terminología usada en el presente documento es con el fin de describir solamente realizaciones en particular.

[0011] Como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno" y "el" incluyen referentes en plural a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un vehículo farmacéutico" incluye mezclas de dos o más de tales vehículos, y similares.

[0012] En el presente documento los intervalos se pueden expresar como de "aproximadamente" un valor en particular, y/o a "aproximadamente" otro valor en particular. Cuando se expresa un intervalo de este tipo, otra realización incluye desde el un valor en particular y/o al otro valor en particular. De forma análoga, cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante el uso del antecedente "aproximadamente", se entenderá que el valor en particular forma otra realización. Adicionalmente se entenderá que los criterios de valoración de cada uno de los intervalos son significativos tanto con respecto al otro criterio de valoración, como independientemente del otro criterio de valoración. También se entiende que existe un número de valores desvelados en el presente

documento, y que cada valor también se desvela en el presente documento como "aproximadamente" ese valor en particular además del valor por sí mismo. Por ejemplo, si se desvela el valor "10", entonces también se desvela "aproximadamente 10". También se debe entender que cuando un valor se desvela como "inferior o igual a", también se desvelan el valor "superior o igual al valor" y posibles intervalos entre valores, como lo entiende de forma  
5 apropiada el experto en la materia. Por ejemplo, si se desvela el valor "10" entonces también se desvela "inferior o igual a 10" así como "superior o igual a 10". También se debe entender que a través de la solicitud, los datos se proporcionan en un número de formatos diferentes, y que estos datos, representando criterios de valoración y puntos de partida, e intervalos para cualquier combinación de los puntos de datos. Por ejemplo, si se desvelan un punto de datos en particular "10" y un punto de datos en particular "15", se entiende que superior a, superior o igual a, inferior  
10 a, inferior o igual a, e igual a 10 y 15 se consideran desvelados así como entre 10 y 15. También se entiende que cada unidad entre dos unidades en particular también se desvela. Por ejemplo, si se desvelan 10 y 15, entonces también se desvelan 11, 12, 13, y 14.

**[0013]** Por "reducir" u otras formas de reducir se hace referencia a la disminución de un suceso o característica. Se entiende que esto está por lo general en relación con algún valor estándar o esperado, en otras palabras, está  
15 relacionado, pero no siempre es necesario, con el valor estándar o relativo al que se refiere. Por ejemplo, "reducir las concentraciones de ácido graso dentro de las composiciones lipídicas total" se refiere a la reducción de la cantidad de concentraciones de ácido graso dentro de composiciones lipídicas total dentro de un microbio productor de aceitemicrobio productor de aceite con respecto a un patrón o un control. Se entiende que, a menos que de forma  
20 específica se indique de otro modo, un compuesto o composición o condición se pueden reducir con respecto a otro compuesto o composición o condición.

**[0014]** Por "aumentar" u otras formas de aumentar se hace referencia al aumento de un suceso o característica. Se entiende que esto está por lo general en relación con algún valor estándar o esperado, en otras palabras, está  
25 relacionado, pero no siempre es necesario, con el valor estándar o relativo al que se refiere. Por ejemplo, "aumentar las concentraciones de ácido graso dentro de las composiciones lipídicas total" se refiere al aumento de la cantidad de concentraciones de ácido graso dentro de las composiciones lipídicas total dentro de un microbio productor de aceitemicrobio productor de aceite con respecto a un patrón o un control. Se entiende que, a menos que de forma  
30 específica se indique de otro modo, un compuesto o composición o condición se pueden aumentar con respecto a otro compuesto o composición o condición.

**[0015]** Por "inhibir" u otras formas de inhibir se hace referencia a obstaculizar o impedir una característica en particular. Se entiende que esto está por lo general en relación con algún valor estándar o esperado, en otras  
35 palabras, está relacionado, pero no siempre es necesario, con el valor estándar o relativo al que se refiere. Por ejemplo, "inhibe una desaturasa" se refiere a que obstaculiza, limita o causa un cese de actividad en la cantidad de actividad de desaturasa de la enzima que se produce con respecto a un patrón o un control. Se entiende que, a menos que de forma específica se indique de otro modo, un compuesto o composición o condición se puede inhibir con respecto a otro compuesto o composición o condición.

**[0016]** Por "prevenir" u otras formas de prevenir se hace referencia a detener una característica o condición en particular. Prevenir no requiere comparación con un control ya que por lo general es más absoluto que, por ejemplo,  
40 reducir o inhibir. Como se usa en el presente documento, algo se podría reducir, pero no inhibir o prevenir, pero algo que se reduce también se podría inhibir o prevenir. Se entiende que cuando se usan reducir, inhibir o prevenir, a menos que se indique de forma específica de otro modo, el uso de los otros dos términos también se desvela de  
45 forma expresa. Por lo tanto, si se desvela que inhibe la actividad de desaturasa de una desaturasa, entonces también se desvela que reduce y evitan la actividad de desaturasa de una desaturasa.

**[0017]** La expresión "terapéuticamente eficaz" se refiere a que la cantidad de la composición usada tiene la cantidad  
50 suficiente para mejorar una o más causas o síntomas de una enfermedad o trastorno. Tal mejora solamente requiere una reducción o alteración, no necesariamente eliminación.

**[0018]** El término "vehículo" se refiere a un compuesto, composición, sustancia o estructura que, cuando está en combinación con un compuesto o composición, ayuda o facilitar la preparación, almacenamiento, administración,  
55 reparto, eficacia, selectividad, o cualquier otra característica del compuesto o composición para su uso o finalidad pretendidos. Por ejemplo, un vehículo se puede seleccionar para minimizar cualquier degradación del principio activo y para minimizar cualquier efecto secundario adverso en el sujeto.

**[0019]** A través de la descripción y las reivindicaciones de la presente memoria descriptiva, el término "comprender" y variaciones del término, tales como "que comprende" y "comprende", se refieren a "e incluye, pero no se limita a",  
60 y no pretende excluir, por ejemplo, otros aditivos, componentes, integrantes o etapas.

**[0020]** El término "célula" como se usa en el presente documento también se refiere a células microbianos individuales, células individuales de microbio productor de aceitemicrobio productor de aceite, o cultivos derivados de células de este tipo. Un "cultivo" se refiere a una composición que comprende células aisladas de un mismo tipo o  
65 de tipos diferentes.

**[0021]** El término "metabolito" se refiere a derivados activos producidos después de la introducción de un compuesto en un medio biológico, tal como un paciente.

5 **[0022]** Cuando se usa con respecto a composiciones farmacéuticas y nutracéuticas, por lo general, en la clínica se entiende que el término "estable" hace referencia a al menos de una cierta cantidad, normalmente un 10 %, de pérdida del principio activo en condiciones de almacenamiento especificadas durante un periodo de tiempo indicado. El periodo de tiempo necesario para que una composición se considere estable es relativo al uso de cada producto y está indicado por las prácticas comerciales de producción del producto, manteniéndolo para control de calidad e  
10 inspección, transportando lo haga un mayorista o de forma directa a un cliente donde se mantiene de nuevo en almacenamiento antes de su uso final, incluyendo un factor de seguridad de un periodo de tiempo de algunos meses, el periodo de caducidad mínimo de los compuestos farmacéuticos es normalmente de un año, y preferentemente de más de 18 meses. Como se usa en el presente documento, el término "estable" hace referencia a estas realidades del mercado y a la capacidad para almacenar y transportar el producto en condiciones  
15 ambientales que se pueden conseguir fácilmente, tales como condiciones refrigeradas, de 2 °C a 8 °C.

**[0023]** En la memoria descriptiva y en las reivindicaciones concluyentes, las referencias a partes en peso, de un elemento componente, en particular en una composición o artículo, representa la relación del peso entre el elemento o componente y cualquier otro elemento o componente en la composición o artículo para el que se expresa una  
20 parte en peso. Por lo tanto, en un compuesto que contiene 2 partes en peso del componente X y 5 partes en peso del componente Y, X e Y se presentan a una proporción de peso de 2:5, y que están presentes en una relación de este tipo independientemente de si en el compuesto están contenidos algunos componentes adicionales.

**[0024]** Un porcentaje de peso de un componente, a menos que se indique de forma específica al contrario, se basa  
25 en el peso total de la formulación o composición en la que está incluido el componente.

**[0025]** "Aislamiento" y cualquier forma tal como "aislar" se refieren a una situación en la que algo que está en una forma en la que se puede manipular o purificar adicionalmente. Aislado y sus formas indican que algo que está en un estado actual que es diferente al de un estado anterior. Por ejemplo, una molécula de ARN ribosómico se puede  
30 "aislar" si, por ejemplo, se retira, se sintetiza o se produce de forma recombinante a partir de un organismo. A menudo, el "aislamiento" de una cosa está en relación con algo más. Por ejemplo, un microbio productor de aceitemicrobio productor de aceite, como se discute en el presente documento, se puede aislar como se discute en el presente documento, mediante, por ejemplo, cultivo del microbio productor de aceitemicrobio productor de aceite, de modo que el microbio productor de aceitemicrobio productor de aceite sobrevive en ausencia de cantidades  
35 apreciables (detectables) de otros organismos. Se entiende que, a menos que de forma específica se indique de otro modo, cualquiera de las composiciones desveladas se puede aislar como sedes de la en el presente documento. Además, el lípido producido a partir de los microbios que producen aceite, como se discute en el presente documento, se pueden aislar a partir de todo o parte del microbio productor de aceitemicrobio productor de aceite.

40 **[0026]** "Purificar" y cualquier forma tal como "purificación" se refiere al estado en el que una sustancia o compuesto o composición está en un estado de mayor homogeneidad de lo que estaba anteriormente. Como se desvela en el presente documento, se entiende que algo puede tener una pureza, a menos que se indique otra cosa, de al menos un 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, 31, 32, 33,  
34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64,  
45 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, o un 100 %. Por ejemplo, si una composición A dada tenía una pureza de un 90 %, esto significaría que un 90 % de la composición era A, y que un 10 % de la composición era una o más cosas, tales como moléculas, compuestos u otras sustancias. Por ejemplo, si un microorganismo eucariota desvelado, por ejemplo, produce un  
50 35 % de DHA, éste se podría "purificar" adicionalmente de modo que la composición del lípido final fuera superior a un 90 % de DHA. A menos que se indique de otro modo, la pureza se determinará con los "pesos" relativos de los componentes dentro de la composición. Se entiende que, a menos que de forma específica se indique de otro modo, cualquiera de las composiciones desveladas se puede purificar como se desvela en el presente documento.

**[0027]** "Opcional" u "opcionalmente" se refiere a que el suceso o circunstancia descrito posteriormente se puede  
55 producir o no, y que la descripción incluye casos en los que dicho suceso circunstancia se produce y casos en los que no se produce.

**[0028]** Los "cebadores" son un subconjunto de sondas que son capaces de soportar algún tipo de manipulación enzimática y que se pueden hibridar con un ácido nucleico diana de modo que la manipulación enzimática se puede  
60 producir. Un cebador se puede preparar a partir de cualquier combinación de nucleótidos o derivados o análogos de nucleótido disponibles en la técnica que no interfieren con la manipulación enzimática.

**[0029]** Los términos "omega-3", "n-3", "ω-3", "omega n-3", y "series n-3 series" se refieren a una familia de ácidos grasos poliinsaturados que tienen en común un doble enlace de carbono-carbono en la posición ω-3. Por ejemplo, el  
65 término "omega-3" significa que el primer doble enlace existe como el tercer enlace de carbono-carbono desde el

extremo de metilo terminal ( $\omega$ ) de la cadena de carbono.

**[0030]** Los términos "omega-6", "n-6", " $\omega$ -6", "omega n-6", y "series n-6" se refieren a una familia de ácidos grasos poliinsaturados que tienen en común un doble enlace carbono-carbono en la posición  $\omega$ -6. Por ejemplo, omega-6  
5 significa que el primer doble enlace existe como el sexto enlace de carbono-carbono desde el extremo de metilo terminal ( $\omega$ ) de la cadena de carbono.

**[0031]** Los términos "omega-9", "n-9", " $\omega$ -9", "omega n-9", y "series n-9" se refieren a una familia de ácidos grasos poliinsaturados que tienen en común un doble enlace carbono-carbono en la posición  $\omega$ -9. Por ejemplo, omega-9  
10 significa que el primer doble enlace existe como el noveno enlace de carbono-carbono desde el extremo de metilo terminal ( $\omega$ ) de la cadena de carbono. Todos los dobles enlaces están en la configuración cis, es decir, los dos átomos de hidrógeno están en el mismo lado del doble enlace.

**[0032]** La expresión "microbio productor de aceite" se refiere a un microbio capaz de  
15 producir aceite como parte de su biomasa. Un "microbio productor de aceite" puede ser un eucariota o procarionta. Por ejemplo, un microbio productor de aceite puede ser un organismo oleaginoso, que es uno que es capaz de acumular aceites y/o grasas por encima de un 20 % de su biomasa seca. Un microbio productor de aceite puede ser una diatomea, una microalga,  
20 un hongo, una bacteria, un protista, una levadura, una planta (tanto terrestre como marina) o un alga.

**[0033]** La expresión "organismo oleaginoso" se refiere a cualquier organismo que puede producir más de un 20 %  
de su biomasa en forma de lípidos. Por ejemplo, un "organismo oleaginoso" puede ser una diatomea, una microalga,  
un hongo, una bacteria, un protista, una levadura, una planta (tanto terrestre como marina) o un alga.

**[0034]** El término "cetocarotenoide" se refiere a un carotenoide que comprende un grupo ceto.

**[0035]** Los términos "isoprenoide" o "terpenoide" se refieren a los compuestos o cualquier molécula derivada de la  
ruta de isoprenoide que incluye terpenoides de 10 carbonos y sus derivados, tales como carotenoides y xantófilas.

**[0036]** El término "carotenoide" se refiere a un compuesto formado por una estructura principal de polieno que se  
30 condensa a partir de una unidad de isopreno de cinco carbonos. Los carotenoides pueden ser acíclicos o pueden terminar con uno (monocíclico) o dos (bicíclico) grupos terminales cíclicos. El término "carotenoide" puede incluir tanto carotenos como carotenoides y xantófilas. Un "caroteno" se refiere a un carotenoide de hidrocarburo. Los  
derivados de caroteno que contienen uno o más átomos de oxígeno, en forma de grupos funcionales hidroxilo, metoxi,  
35 oxo, epoxi, carboxi, o aldehídico, o dentro de glicósidos, ésteres de glicósidos, o sulfatos, se conocen de forma colectiva como "carotenoides y xantófilas". Los carotenoides que son particularmente adecuados son los carotenoides monocíclicos y bicíclicos.

**[0037]** Las expresiones "grupo ceto" o "grupo cetona" se usarán indistintamente y se refieren a un grupo en el que  
40 un grupo carbonilo está unido a dos átomos de carbono:  $R_2CO$  (ningún R puede ser H).

**[0038]** La expresión "antagonistas de producción de ácido graso", como se usa en el presente documento, se refiere  
a subunidades de ácido graso y moduladores de la ruta de ácido graso.

**[0039]** Las expresiones "subunidad de ácido graso" o "subunidades de ácido graso", como se usan en el presente  
45 documento, se refieren a los ácidos grasos de 16, 18, 20, 22 o 24 carbonos implicados en la ruta metabólica para la producción de los PUFA por los microbios que producen aceite desvelados. Por ejemplo, las "subunidades de ácido graso" pueden incluir cualquiera de los ácidos grasos de 16, 18, 20, 22 o 24 carbonos que se muestran en la Figura  
1.

**[0040]** Una "subunidad de ácido graso" también puede hacer referencia a cualquier ácido graso de 16, 18, 20, 22 o  
50 24 carbonos que tenga 1, 2, 3, 4, 5 o 6 insaturaciones implicadas en la ruta metabólica para la producción de los PUFA por los microbios que producen aceite desvelados. Algunas realizaciones adicionales pueden incluir ácidos grasos con un número impar de átomos de carbono, con o sin insaturaciones tales como ácidos grasos de 15, 17, 19  
55 y 21 carbonos encontrados dentro de organismos marinos.

**[0041]** La expresión "moduladores de la ruta de ácido graso", como se usa en el presente documento, se refiere a  
compuestos capaces de inhibir una o más de las enzimas implicadas en la ruta metabólica para la producción de los  
PUFA por los microbios que producen aceite desvelados.

**[0042]** Los documentos JP 11 075884 A (AGENCY OF IND SCI & TECHNOLOGY, 23 de marzo de 1999) y BASE  
60 DE DATOS WPI, AN 1999-257711 (semana 199922, Thomson Scientific) desvelan un método para preparar una composición lipídica que comprende: cultivar un microbio productor de aceite en un medio heterótrofo que comprende un antagonista de producción de ácido graso, en el que el microbio productor de  
65 aceite es SR21 de *Schizochytrium limacinum* que tiene una secuencia de 18S con una

identidad de un 90 % con la secuencia de la SEQ ID NO: 1, y en el que el antagonista de producción de ácido graso es el ácido toluico.

5 **[0043]** El documento de BURJA, A.M. *ET AL.*: "Isolation and characterization of polyunsaturated fatty acid producing *Thraustochytrium* species: screening of strains and optimization of omega-3 production" (APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 72, nº. 6, 20 de abril de 2006, páginas 1161-1169) desvela un método para preparar una composición lipídica que comprende: cultivar un microbio productor de aceite/microbio productor de aceite en un medio heterótrofo, en el que el microbio productor de aceite/microbio productor de aceite es ONC-T18 de *Thraustochytrium sp.*, que corresponde a la cepa PTA-6245, que tiene la secuencia de 18S de la SEQ ID NO: 1.

10 **[0044]** El documento EP 1 818 410 A1 (SUNTORY LIMITED, 15 de agosto de 2007) desvela un método para preparar una composición lipídica que comprende: cultivar un microbio productor de aceite/microbio productor de aceite en un medio heterótrofo que comprende un antagonista de producción de ácido graso, en el que el microbio productor de aceite/microbio productor de aceite se pueda seleccionar entre el género *Thraustochytrium* o el género *Schizochytrium*. También se sugiere, además de aumentar el rendimiento del ácido graso poliinsaturado, añadir al medio un precursor para el ácido graso poliinsaturado, tal como ácido oleico.

15 **[0045]** 58. Se desvelan los componentes a usar para preparar las composiciones desveladas así como las composiciones por sí mismas a usar dentro de los métodos desvelados en el presente documento. Estos y otros materiales se desvelan en el presente documento, y se entiende que cuando se desvelan combinaciones, subconjuntos, interacciones, grupos, etc. de estos materiales que, aunque la referencia específica de cada diversa combinación y permutación individual y colectiva de estos compuestos puedan no divulgarse de forma específica, cada una se contempla y se describe específicamente en el presente documento. Por ejemplo, si se desvela y se discute una especie en particular de la familia *Thraustochytriaceae* y se discute un número de modificaciones que se pueden realizar a un número de organismos que incluyen especies de la familia *Thraustochytriaceae*, de forma específica se contempla todas y cada una de las combinaciones y permutaciones de estas especies de la familia *Thraustochytriaceae* y las modificaciones que son posibles a menos que se indique lo contrario de forma específica. Por lo tanto, si se desvela una clase de moléculas A, B, y C así como una clase de moléculas D, E, y F y se desvela un ejemplo de una molécula de combinación, A-D, entonces incluso si cada una no se menciona de forma individual, cada una es la combinación contemplada de forma individual y colectiva, A-E, A-F, B-D, B-E, B-F, C-D, C-E, y C-F que se consideran desveladas. De forma análoga, de estos también se desvela cualquier subconjunto o combinación. Por lo tanto, por ejemplo, el subgrupo de A-E, B-F, y C-E se debería considerar desvelado. Este concepto se aplica a todos los aspectos de la presente solicitud que incluyen, pero no se limitan a, etapas en los métodos de preparación y uso de las composiciones desveladas. Por lo tanto, si existe una diversidad de etapas adicionales que se pueden realizar, se entiende que cada una de estas etapas adicionales se puede realizar con cualquier realización o combinación de realizaciones específicas de los métodos desvelados.

## B. Composiciones

40 **[0046]** Se desvelan microbios que producen aceite del orden *Thraustochytriales*, preferentemente especies de *Thraustochytrium* o *Schizochytrium*, que tienen la capacidad de producir lípidos, tales como ácidos grasos, tales como ácidos grasos insaturados, tales como ácidos grasos omega-3, tales como ácidos grasos omega-6, y ácidos grasos omega-9, tales como la serie (n-3) de ácido docosahexaenoico (DHA), ácido docosapentaenoico (DPA) y ácido eicosapentaenoico (EPA), la serie (n-6) de DPA y la serie (n-9) de de los ácidos palmítico y esteárico.

50 **[0047]** Los microbios que producen aceite desvelados también pueden producir antioxidantes, tales como, pero no limitados al compuesto carotenoide, caroteno, (por ejemplo  $\beta$ -caroteno) y a los compuestos xantófilos, astaxantina, zeaxantina, beta-criptoxantina, cantaxantina, y equinenona.

**[0048]** También se desvelan condiciones para el aislamiento y crecimiento de los microbios que producen aceite. Por ejemplo, con la presente se presentan condiciones de crecimiento de heterótrofo para la producción de los lípidos y antioxidantes desvelados, por ejemplo, tanto de forma individual como acumulativa. Por consiguiente, a través del uso de los microbios que producen aceite desvelados, es posible producir de forma eficaz la serie (n-3) de DHA, EPA y DPA y/o la serie (n-6) de DPA y/o la serie carotenoide de compuestos antioxidantes y/o la serie xantófila de compuestos antioxidantes, que son útiles como o dentro de agentes nutracéuticos, aditivos alimentarios, agentes farmacéuticos o industria.

60 **[0049]** Se desvelan composiciones que comprenden un microbio productor de aceite/microbio productor de aceite que comprende o que consiste en una especie de *Thraustochytrium*, siendo un ejemplo que se desvela en el presente documento la cepa ONC-T18 que tiene un número de registro de depósito de cepa en la ATCC de PTA-6245.

65 **[0050]** Se entiende que también se desvelan los microbios que producen aceite y cualquier clon, organismos modificados o genes aislados a partir de dicho organismo como se expone en la cepa ONC-T18. Los microbios que

producen aceite desvelados tienen la capacidad de producción ácidos grasos insaturados, tales como lípidos que contienen la serie omega-3 de DHA, EPA y DPA, y la serie omega-6 de DPA y diversos antioxidantes tales como agentes carotenoides, carotenoides y xantófilas y fenólicos .

5 **[0051]** También se desvelan procesos para la producción de biomasa que contiene dichos compuestos. Además se desvelan procesos para preparar compuestos omega-3, omega-6 y carotenoides usando los microbios que producen aceite. También se desvelan procesos para la producción de aceites derivados de microbios (o de una sola célula).

10 **[0052]** Además, se desvelan los ácidos grasos y carotenoides producidos por el microbio productor de aceitemicrobio productor de aceite desvelado y cualquier progenie (modificada genéticamente o de otro modo), diversos piensos, agentes nutracéuticos, agentes farmacéuticos y alimentos suplementados con los lípidos y antioxidantes, así como un proceso para usar estos compuestos como un aditivo para diversos piensos y alimentos.

15 **[0053]** La Patente de Estados Unidos n.º 5.130.242 de Barclay desvelaba un proceso de recogida e identificación sistemática para aislar cepas de microorganismos con las siguientes características para la producción de ácidos grasos omega-3: 1) capaz de crecimiento heterótrofo; 2) producir un alto contenido de ácidos omega-3; 3) unicelulares; 4) producir un bajo contenido de ácidos grasos convencionales y ácidos grasos omega-6; 5) células no pigmentadas, de color blanco o incorporadas; 6) termotolerantes (por ejemplo, capacidad para crecer por encima de 30 °C); y 7) eurihalinas (por ejemplo, capacidad para crecer en un amplio intervalo de salinidades, pero  
20 preferentemente en salinidad baja).

**[0054]** La divulgación '242 también describe un proceso para la producción heterótrofa de productos microbianos de células completas o extraídos con una concentración elevada de ácidos grasos omega-3 fatty, que posteriormente se pueden usar en productos alimenticios para animales o seres humanos. Este proceso usa microorganismos  
25 identificados mediante el proceso de recogida e identificación sistemática desvelado de los mismos. Estos microorganismos, que son del orden Thraustochytriales, se cultivan en grano molido. Para aumentar la producción de ácidos grasos omega-3, se usa estrés a baja temperatura y en niveles altos de oxígeno disuelto, así como la adición de antioxidantes, factores de crecimiento, vitaminas y fósforo. Los productos extraídos contienen concentraciones elevadas de ácidos grasos omega-3 (por ejemplo, C20:5w3, C22:5w3; y C22:6w3) y concentraciones bajas de  
30 ácidos grasos omega-6 (por ejemplo, C20:4w6 y C22:5w6). De forma específica, las proporciones de los ácidos grasos C20:5w3 con respecto a C22:6w3 varían de 1:1 a 1:30. Las proporciones de ácidos grasos C22:5w3 con respecto al C22:6w3 varían de 1:12 a solamente cantidades traza de C22:5w3. Además, los microorganismos producen de un 0,6 a un 0.72 % de DHA, de un 0 a un 5 % de DPA, y de un 0 a un 18,9 % de EPA, en peso de ácido  
35 graso total.

**[0055]** La Patente de Estados Unidos n.º 6.451.567 de Barclay desvelaba un proceso para el crecimiento de *Thraustochytrium* y *Schizochytrium* en un medio sin cloruro (< 3 g/l) que contiene sales sódicas (por ejemplo, sulfato sódico). El medio sin cloruro da como resultado tamaños de agregado celular inferiores a 150 µm. El proceso desvelado produce microorganismos y extractos que son útiles en productos alimenticios para acuicultura. Algunos  
40 componentes adicionales de los productos alimenticios incluyen harina de semillas de lino, de semillas de colza, de semilla de soja, y de aguacate. Los microorganismos pueden producir hasta 1,08 g de ácidos grasos omega-3 por litro de medio al día. La divulgación '567 describe adicionalmente diversos medios de, que incluyen agua de mar, glucosa (1, 3, 5, o 10 g/l), extracto de levadura (0,01, 0,2, 0,4 y 5 g/l), puentes de nitrógeno regionales tales como hidrolizado de proteína (1 g/l), extracto de hígado (1 g/l), glutamato (5 g/l), glutamato monosódico (MSG) (3 g/l), y  
45 sales adicionales, vitaminas traza y minerales (por ejemplo, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, y extracto de gelatina).

**[0056]** La Patente de Estados Unidos n.º 6.582.941 de Yokochi *et al.* desvela una especie de *Schizochytrium*, cepa SR21 y otra cepa de *Schizochytrium* que pertenece a la misma especie que tiene la capacidad de producir fracciones de ácido graso que tienen una concentración elevada de DHA omega-3 y/o DPA omega-6 y una  
50 concentración baja de EPA. Además, se desvelan métodos para cultivar tales microorganismos y aislar cables ácidos grasos. El medio usado contiene sal marina, extracto de levadura (0,2, 1,0, o 10 g/l), agua de macerado de maíz (0,5, 1,0, o 10 g/l), glucosa (10-120 g/l), además de sales adicionales (por ejemplo, NH<sub>4</sub>OA<sub>c</sub>, fosfatos). Las composiciones de ácido graso contienen de aproximadamente un 15 a un 20 % de DHA en peso de biomasa (aproximadamente un 28 % en peso de ácido graso total). Las composiciones se pueden usar en productos  
55 alimenticios (por ejemplo, leche infantil).

**[0057]** La Patente de Estados Unidos n.º 6.607.900 de Bailey *et al.* desvelaba un proceso para el crecimiento de microorganismos eucariotas (por ejemplo, 20888 de la ATCC de *Schizochytrium* sp.) que son capaces de producir al menos un 20 % su biomasa como lípidos poliinsaturados (en particular ácidos grasos omega-3 y -6). El proceso  
60 implica el cultivo de los microorganismos en un medio que contiene una fuente de carbono y nitrógeno. También se desvela el uso de niveles bajos de oxígeno disuelto (inferiores a un 3 %) y bajos niveles de ión cloruro (inferiores a 3 g/l) para aumentar la producción. Los microorganismos tienen una tasa de producción de lípido de al menos 0,5 g/l/h. La fracción lipídica es de un 15 a un 20 % de DHA en peso de biomasa (aproximadamente un 35 % en peso de los ésteres de metilo del ácido graso total).

65

**[0058]** La publicación de Estados Unidos n.º 2004/0161831 de Komazawa *et al.*, desvela una cepa de *Thraustochytrium* (LEF1; número de registro FERM BP-08568 en el Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology, Japón) que tiene la capacidad de producir DHA. Mediante cultivo en medios convencionales, el microorganismo puede producir aceite con al menos un 50 % en peso de DHA. El aceite se puede tratar con una lipasa antes del aislamiento de DHA. El aceite se puede usar en alimentos o bebidas o el DHA se puede hidrolizar para producir ácido behénico.

### 1. Ácidos grasos

**[0059]** Los ácidos grasos son cadenas de hidrocarburo que terminan en un grupo carboxilo, que se denominan insaturados si contienen al menos un doble enlace carbono-carbono, y poliinsaturados cuando contienen múltiples enlaces de este tipo. Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (PUFA) o ácidos grasos altamente insaturados (HUFA), se pueden dividir en las series (n-3) y (n-6) como resultado de la colocación de estos dobles enlaces. Existe una evidencia científica abrumadora de los ácidos grasos altamente insaturados (n-3) tales como DHA tienen un efecto positivo en enfermedades cardio-circulatorias, inflamación crónica y trastornos cerebrales. Por otro lado, los ácidos grasos (n-6) se han observado como metabolitos intermedios dentro de los esteroides de eicosanoides, tales como prostaglandinas, leucotrienos o similares.

**[0060]** Los ácidos grasos poliinsaturados pueden comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 dobles y/o triples enlaces carbono-carbono. Por ejemplo, los ácidos grasos poliinsaturados pueden comprender 3-8, 4-7, o 5-6 dobles y/o triples enlaces carbono-carbono.

**[0061]** En la actualidad, la fuente principal de estos ácidos grasos altamente insaturados es el pescado, con EPA y DHA observados dentro de diversas especies de pescados (tales como sardinas, anchoas, sardinas y atún) en cantidades de aproximadamente un 20 % y un 10 %, respectivamente. Además, si se pretende usar aceite de pescado como la única fuente de estos lípidos, en varias desventajas, tales como problemas con contaminación del sabor, fluctuaciones de disponibilidad incontrolables, variabilidad natural del contenido de aceite de pescado, así como el potencial de acumular contaminantes ambientales nocivos si no se procesa de forma correcta. Además, si se pretende obtener un aceite (n-3) o (n-6) altamente purificado a partir de dichas fuentes, es muy difícil separar y purificar preferentemente los aceites deseados sin un procesamiento extenso. De forma específica, está disponible un gran mercado dentro del mercado de los suplementos neonatales para una forma altamente concentrada de DHA. Si el aceite de pescado fuera la fuente de dichos productos, entonces el DHA se tendría que aislar preferentemente en grandes cantidades a partir del EPA. Claramente, se necesita una fuente alternativa de fuente altamente purificada y de producción/o fuente a medida del cliente de estos ácidos grasos altamente insaturados. Una fuente de este tipo es el uso de antagonistas de producción de ácido graso que influye directamente en la ruta metabólica del lípido o los asociados con la producción de ácidos grasos, tales como la ruta de carotenoides que se produce en paralelo con lípidos por sus propiedades antioxidantes en microbios que producen aceite.

**[0062]** Shirasaka *et al.* (2005) *Mycoscience* 46: 358-363 usaron tanto cianocobalamina como ácido p-toluico para modificar la composición de ácidos grasos de SR21 de *Schizochytrium limacinum*, mediante la regulación positiva de la metilmanoil-CoA mutasa dependiente de cobalamina responsable de la conversión del ácido propiónico en ácido succínico en el caso de la cianocobalamina (un componente activo de la vitamina B<sub>12</sub>) y mediante reducción de la concentración de DPA omega-6 y aumento de la concentración de EPA de una manera dependiente de la dosis, con respecto al suplemento con ácido p-toluico.

**[0063]** Además de aceites de pescado, diversos microorganismos (principalmente marinos) son capaces de producir y/o acumular la serie (n-3) del ácido docosahexaenoico. De interés en particular es el hecho de que la producción microbiana no está sometida a fluctuaciones causadas por variables externas tales como estacionalidad, clima y suministro de alimentos. Por ejemplo, se sabe que los siguientes microbios que producen aceite tienen la capacidad de producir DHA: la bacteria *Vibrio marinus* obtenida en aguas profundas (ATCC 15381), T3615 de *Vibrio* sp., SS9 de *Photobacterium profundum*, MP-1 de *Mortierella marina* y *Psychromonas kaikoe* (ATCC BAA-363T); especies de microalgas tales, *Cryptothecodinium cohnii*, *Ciclotella cryptica*, y *Mortierella alpina* (1S-4); y los protistas *Thraustochytrium* sp. (ATCC 20892), *Thraustochytrium aureum* (ATCC 34304) y *Thraustochytrium roseum*. De acuerdo con un proceso que usa estos organismos y picados, sin embargo, la cantidad de ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico, ácido docosahexaenoico producida por gramo de biomasa por litro es baja, estando dentro del intervalo de 10 a 500 mg. En la Figura 5 se muestran algunos ejemplos y organismos microbianos que producen los aceites representativos.

**[0064]** Se ha mostrado que los omega 3 tienen efectos beneficiosos y los aceites y composiciones desvelados en el presente documento se pueden usar para efectos antiinflamatorios en fibrosis quística (Cochrane Database Syst Rev. 3), artritis reumatoide (Drugs 63: 845-53), asma (Ann Allergy Asthma Immunol 90: 371-7) y apoplejía trombótica (Prev Cardiol 6: 38-1), agentes cardioprotectores, así como un efecto directo en la arterioesclerosis y arritmia (Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 63: 351-62), inhibición de la proliferación del cáncer en líneas de células de cáncer de mama y próstata y reducción en experimentos animales (Am J Clin Nutr 77: 532-43), efecto antipsicótico en la esquizofrenia (J Neural Transm Suppl 64: 105-17) y otras enfermedades psiquiátricas (Can J Psychiatry 48: 195-203), suplemento inmunonutriente usado para desarrollo neonatal normal y en el tratamiento de

infecciones neonatales (Eur J Pediatr 162: 122-8), y tratamiento del dolor patológico mediante la atenuación directamente de los procesos neuronales y ganglionares que subyacen al dolor neuropático e inflamatorio (Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 68: 219-24).

## 5 2. Thraustochytriaceae

### a) ONC-T18

**[0065]** Un ejemplo de un microbio productor de aceite es el la cepa ONC-T18 del microorganismo marino. La cepa ONC-T18 del microorganismo marino, como se desvela en el presente documento, se recogió como parte de una cepa de aislamiento microbiano que produce PUFA, con más de 60 cultivos puros aislados (para detalles véase la tabla 7). Además, la cepa ONC-T18 se aisló de las hojas de hierbas de pantano salado en el área de Advocate Harbor, Bahía de Fundy, nueva Escocia, Canadá. A través de exámenes microscópicos, técnicas de purificación de cultivo en serie, y técnicas de secuenciación de ADN, se encontró que la cepa era un solo microorganismo perteneciente al género *Thraustochytrium*. Todas las cepas y dos cultivos de comparación de la ATCC (ATCC 20891 y MYA-1381) se cultivaron en glucosa al 0,5 %, peptona al 0,2 %, extracto de levadura al 0,2 % en agua marina (SW) y se sometió a análisis de cromatografía de gases (éster de metilo del ácido graso, FAME).

**[0066]** La Figura 6 muestra un diagrama de árbol ramificado, filogenético propuesto de la relación entre ONC-T18, y otros miembros del orden *Labyrinthulida*, basándose en la comparación de secuencias obtenidas a través del uso del gen del ARN ribosómico de 18S altamente conservado.

**[0067]** La Figura 4 muestra un árbol filogenético desarrollado usando técnicas de análisis Neighbour-Joining y Bootstrap para determinar la relación de ONC-T18 con otros miembros de la familia *Thraustochytriidae*, usando de nuevo el gen del ARN ribosómico de 18S secuenciado directamente y comparando con otras secuencias dentro del dominio público que usando similitud de matrices.

**[0068]** La cepa ONC-T18 se aisló originalmente usando técnicas clásicas de cebo de polen de pino, seguido de cultivo en medio selectivo. De forma específica, se preparó un medio de nutrientes que contenía 5 g l<sup>-1</sup> de glucosa, 2 g l<sup>-1</sup> de peptona, 2 g l<sup>-1</sup> de extracto de levadura a 1 l de agua de mar filtrada con un filtro de 0,2 µm. El perfil de ácido graso de ONC-T18 se determinó a continuación usando el método de extracción de Bligh y Dyer y técnicas de cromatografía de gases para PUFA. Los resultados de cromatografía demostraron la capacidad de esta cepa para producir cantidades crecientes de ácidos grasos totales (TFA), DHA, así como cantidades notables de EPA y DPA (ácidos grasos tanto n-3 como n-6).

**[0069]** Los microbios que producen aceite desvelados, incluyendo ONC-T18, se pueden usar en un proceso para preparar un lípido o grasa que contiene DHA, EPA y DPA, pero no limitados a las cepas de ONC-T18 o PTA-6245 mencionadas anteriormente, ni a cualquier derivación de dicha cepa ya sea a través de modificación genética, mutagénesis química, adaptación fermentativa o cualquier otro medio para producir mutantes de la cepa, con lo que el producto de estas modificaciones tiene características genéticas, morfológicas y/o funcionales tales como las de los microbios que producen aceite, como se desvela en el presente documento.

**[0070]** Se desvelan microbios que producen aceites que pueden producir una composición lipídica que tiene propiedades de clase lipídica distintivas, y la solución al problema del mantenimiento de una fuente estable, fiable y económica para un lípido de este tipo que tiene una funcionalidad elevada y un valor adicional de acuerdo con el mismo. Por lo tanto, en el presente documento se desvelan cepas de tipo silvestre que producen la serie (n-3) de DHA y la serie (n-6) de DPA hasta un mayor grado así como cepas variantes y recombinantes diseñadas para producir estos ácidos grasos poliinsaturados hasta un mayor grado. Tales microorganismos variantes o recombinantes incluyen los diseñados para que tengan un contenido más elevado de dichos lípidos que los producidos con la cepa de tipo silvestre original, cuando se cultiva usando las mismas condiciones y medios. Además, también se incluyen los microorganismos diseñados para producir un contenido de lípido con cantidades similares de la serie (n-3) de DHA, EPA y la serie (n-6) de DPA que se pueden seleccionar, en comparación con las cepas correspondientes de tipo silvestre, usando de forma eficaz sustratos que tienen un rendimiento de coste superior.

**[0071]** También se desvelan composiciones que comprenden microbios que producen aceite del orden Thraustochytriales en las que el microbio productor de aceite produce ácidos grasos insaturados. Los ácidos grasos poliinsaturados pueden ser, por ejemplo, ácidos grasos omega-3 u omega-6, tales como DHA y DPA.

**[0072]** También se desvelan composiciones que comprenden uno o más microbios que producen aceite del orden Thraustochytriales en las que el microbio(s) que produce aceite produce ácidos grasos específicos cuando su crecimiento se suplementa con antagonistas de producción de ácido graso.

65

**[0073]** También se desvelan composiciones que comprenden uno o más microbios que producen aceite del orden Thraustochytriales en las que el microbio(s) que produce aceite produce cantidades elevadas de ácidos grasos insaturados específicos, por ejemplo ácidos grasos omega-3, tales como EPA suplementando medios fermentativos convencionales con uno o más antagonistas de producción de ácido graso. El uso del ácido oleico de esta manera se ilustra en la Figura 9 y en el ejemplo 14(c).

**[0074]** Se desvelan composiciones que comprenden un microbio productor de aceite/microbio productor de aceite, en las que la composición produce un lípido.

**[0075]** También se desvelan composiciones que comprenden un microbio(s) que produce aceite, en las que la composición produce un lípido, en la que el lípido comprende un lípido como se desvela en el presente documento.

**[0076]** También se desvelan composiciones que comprenden uno o más microbios que producen aceite del orden Thraustochytriales en el que el microbio(s) que produce aceite produce compuestos cetocarotenoides. Los compuestos cetocarotenoides incluyen, pero no se limitan a, carotenoides y xantófilas, tales como  $\beta$ -caroteno y astaxantina.

**[0077]** Los carotenoides son compuestos solubles lipídicos que se producen de forma natural, sintetizados a partir del precursor omnipresente pirofosfato de isopentenilo  $C_5$ , y su isómero estructural pirofosfato de dimetilalilo. Los carotenoides forman un grupo de compuestos altamente diverso, abundante. Dentro de este grupo de compuestos, existen dos clases, los carotenoides del hidrocarburo, carotenos, y derivados oxigenados de carotenos, xantófilas.

**[0078]** Los carotenoides también son uno de los grupos más abundantes y diversos de compuestos de origen natural en la tierra, que son responsables de la energía del mundo en el que vivimos. Tradicionalmente, los carotenoides se han usado en las industrias alimentarias, de comida y de agentes nutracéuticos. Se producen en todas partes con organismos fotosintéticos, que incluyen cianobacterias, pero también se extienden ampliamente entre bacterias y hongos no fotosintéticos (Goodwin, *The Biochemistry of Carotenoids*. New York: Chapman y Hall (1980)). Aunque los carotenoides se clasifican como metabolitos secundarios, se sabe que son vitales para el crecimiento y la fotosíntesis de las plantas. Los carotenoides también son esenciales para muchos organismos superiores, incluyendo los seres humanos, muchos de los cuales no son capaces de sintetizar estos compuestos. Por lo tanto, la ingesta dietética es la única fuente de carotenoides para muchos organismos. Como resultado de la investigación en fuentes dietéticas, y el consumo real de carotenoides, en los últimos años se ha producido mucho interés. En 2006, se calculó que el mercado global de carotenoides tenía una importancia de aproximadamente 954,7 millones de dólares americanos, con expectativas de argumento para esto a 1069,2 millones de dólares americanos en 2010 (*Carotenoids: A Global Strategic Business Report*, 2006).

**[0079]** Un papel de los carotenoides dietéticos es el de un precursor de la vitamina A (retinoides). La deficiencia de vitamina A es significativa que es la causa principal de ceguera evitable en niños, aunque también aumenta los riesgos de enfermedad y muerte por infecciones graves (OMS). Como antioxidantes dietéticos, los carotenoides tales como  $\beta$ -caroteno, licopeno, astaxantina, cantaxantina y luteína, presentan actividades anticáncer significativas, y desempeñan un papel importante en la prevención de enfermedades crónicas (Edge, *B-Biology* 4, 41, 189-200 (1997); Singh, *Oncology-New York*, 12, 1643 (1998); Smith, *British Journal of Biomedical Science*, 55, 268-275 (1998)). Además, el consumo de grandes cantidades de carotenoides se ha relacionado con la reducción de apariciones de enfermedades degenerativas tales como degeneración macular relacionada con la edad, la causa principal de ceguera relacionada con la edad, así como algunos cánceres y enfermedad cardíaca crónica (Basu, *JAOCS*, 78 (7), 665-675 (2001); Mares-Perlman *et al.*, *J Nutr*, 132 (3), 518S-524S (2002)).

**[0080]** Debido a su estructura principal de dobles enlaces conjugados, los carotenoides son antioxidantes biológicos potentes que pueden absorber la energía excitada del oxígeno singlete en la cadena de carotenoide, conduciendo a la degradación de la molécula de carotenoide, pero evitando que se produzcan daños en otras moléculas o tejidos (Schagerl y Muller, *J Plant Physiol* 2005). Los carotenoides se pueden dividir en dos clases estructuralmente distintas, los carotenos y xantófilas. Los carotenos poseen una estructura principal de hidrocarburos, mientras que las xantófilas contienen uno o más grupos funcionales que contienen oxígeno (Armstrong y Hearst, *Faseb J*, 10 (2), 228-3 (1996); Armstrong, *Annu Rev Microbiol*, 51, 629-59 (1997)). Los carotenos son comunes para muchos organismos, con un modo altamente conservado de biosíntesis. Por otro lado, las Xantófilas se producen por un grupo pequeño de organismos. Los productos finales y las vías de síntesis a menudo son específicos de la especie. De los Carotenoides, las xantófilas son las que atraen el mayor interés, de forma específica  $\beta$ -caroteno, cantaxantina y astaxantina. Con el  $\beta$ -caroteno demandando la porción más grande del mercado global, mientras que cantaxantina y astaxantina dominan un 14,92 % y un 21,58 % del mercado, respectivamente (*Carotenoids: A Global Strategic Business Report*, 2006).

**[0081]** Las xantófilas incluyen diversos compuestos tales como los cetocarotenoides, equinenona y cantaxantina, sintetizados mediante la adición de uno o dos grupos carbonilo en las posiciones 4 y 4' del anillo de  $\beta$ -ionona del  $\beta$ -caroteno, respectivamente. Una reacción catalizada por la clase de genes se conoce de forma colectiva como genes de la  $\beta$ -caroteno cetolasa. La  $\beta$ -critpoxantina y la zeaxantina también se clasifican como xantófilas, se sintetizan mediante la sustitución directa de un átomo de hidrógeno en las posiciones 3 y 3' del anillo de  $\beta$ -ionona del  $\beta$ -

caroteno con un grupo hidroxilo (Tian y DellaPenna, Arch Biochem Biophys, 430 (1), 22-9 (2004)). Además, existe un exceso de carotenoides cetos e hidroxilados combinados, tales como 3-hidroxi- $\beta$ -ionona, 3'-hidroxi- $\beta$ -ionona, adonixantina, y adonirrubina. Todos los compuestos mencionados en el presente documento son compuestos valiosos por su propio derecho con importantes propiedades, pero constituyen de forma significativa precursores importantes para la biosíntesis de la astaxantina. La astaxantina es el producto final de esta ruta, siendo tanto hidroxilada, como cetolada en los carbonos 3, 3' y 4,4' de los anillos de  $\beta$ -ionona del esqueleto de  $\beta$ -caroteno. La ruta real a partir de  $\beta$ -caroteno a astaxantina no está bien caracterizada, y puede demostrar que es específica de la especie (Tao *et al.*, Metab Eng. (2006)).

5 [0082] También se desvelan composiciones que comprenden un microbio productor de aceite/microbio productor de aceite, en las que la composición produce un antioxidante.

[0083] También se desvelan composiciones en las que el microbio productor de aceite/microbio productor de aceite comprende un miembro del orden Thraustochytriales.

15 [0084] También se desvelan composiciones en las que el microbio productor de aceite tiene una secuencia genética de ARN ribosómico de 18S que tiene una identidad de al menos un 80 % con la SEQ ID NO: 1.

[0085] También se desvelan composiciones en las que el microbio productor de aceite tiene una secuencia genética de ARN ribosómico de 18S que tiene una identidad de al menos un 80 % con el número de registro DQ374149 de GenBank.

[0086] Se entiende que se puede usar cualquier forma de caracterización descrita en el presente documento, tal como mediante genética o con las firmas del lípido o mediante las clasificaciones para los microbios que producen aceite para caracterizar a los microbios que producen aceite como se desvela en el presente documento. Los microbios que producen aceite pueden comprender uno o más microorganismos de la familia Thraustochytriaceae, y algunos ejemplos son los números de registro 20888, 20889, 20890, 20891, 20892 y PTA-6245 de la ATCC. Existe una diversidad de características que se pueden usar con respecto a los organismos y los ácidos grasos insaturados o carotenoides que producen. Se entiende que estos se pueden usar en cualquier combinación o permutación para definir un conjunto o conjuntos de organismos o aceites o antioxidantes, por ejemplo. Una característica es la clasificación de los organismos por sí mismos, la identificación genética de los organismos, los perfiles de lípido y antioxidante de los organismos, y las condiciones de crecimiento de los organismos, por ejemplo.

#### b) Clasificación

35 [0087] Los microbios que producen aceite que se pueden usar en los métodos que se describen en el presente documento pueden ser del filo Labyrinthulomycota. Los microbios que producen aceite pueden ser de la clase Labyrinthulomycetes. Los microbios que producen aceite pueden ser de la subclase Thraustochytridae. Los microbios que producen aceite pueden ser del orden Thraustochytriales. Los microbios que producen aceite pueden ser de la familia Thraustochytriaceae. Los microbios que producen aceite pueden ser del género *Thraustochytrium*.

40 Los microbios que producen aceite pueden ser un *Thraustochytrium* sp. Los microbios que producen aceite pueden ser *Thraustochytrium aureum*. Los microbios que producen aceite pueden ser *Thraustochytrium roseum*. Los microbios que producen aceite pueden ser *Thraustochytrium striatum*. Los microbios que producen aceite pueden ser del género *Schizochytrium*. Los microbios que producen aceite pueden ser *Schizochytrium* sp. Los microbios que producen aceite pueden ser una versión modificada de cualquiera de los microbios que producen los aceites

45 mencionados. Los microbios que producen aceite también pueden comprender cualquier miembro desconocido poco aislado en la actualidad de dicha clase, su clase, orden, familia o género de procariotas. Una combinación de microbios que producen aceite puede ser cualquier combinación de cualquier microbio productor de aceite desvelado en el presente documento, que incluye uno o más de *Thraustochytrium* sp., *Schizochytrium* sp., *Thraustochytrium aureum*, *Thraustochytrium striatum* y *Thraustochytrium roseum*.

50 [0088] Los microbios que producen aceite de la familia Thraustochytriaceae pueden ser cualquiera de los desvelados anteriormente. Los microbios que producen aceite pueden comprender el organismo que tiene el número de registro PTA-6245 de la ATCC.

#### 55 c) Genética

[0089] Los microbios que producen aceite pueden tener la secuencia de ARNr de 18S de la SEQ ID NO: 1. Los microbios que producen aceite pueden tener la secuencia de ARNr de 18S que se describe en el número de registro DQ374149 de GenBank. El microbio productor de aceite puede tener una secuencia de ARNr de 18S que, por ejemplo, tiene una homología de aproximadamente un 90 %, o cualquier otra identidad desvelada en el presente documento, con la SEQ ID NO: 1. El microbio productor de aceite puede tener una secuencia de ARNr de 18S que se hibrida en condiciones rigurosas, o cualquier otra condición como se desvela en el presente documento, a la SEQ ID NO: 1, o a una porción de la SEQ ID NO: 1.

65 [0090] La similitud/identidad de secuencias e hibridación de ácido nucleico de los ácidos nucleicos de los

organismos pueden ser como se describe en el presente documento. De forma específica, la comparación de la SEQ ID NO: 1 con secuencias de ácidos nucleicos encontradas en la base de datos genómica, GenBank (Centro Nacional de Información Biotecnológica, Instituto Nacional de la Salud, Bethesda, MD, USA) usando el algoritmo BLAST (Herramienta de Búsqueda Básica de Alineamiento Local) identificado en la SEQ ID NO: 1 como la más relacionada (similitud de un 91 %) con varias especies de Traustochytridos eucariotas, muy relacionados con CHN-1 [AB126669] de *Thraustochytrium sp.* (similitud de un 94,5 %) y N1-27 [AB073308] de *Thraustochytriidae sp.* (similitud de un 95,5 %), y la más relacionada con [AF265338] de *Thraustochytrium striatum* (similitud de un 97,5 %).

### 3. Plantas

10

[0091] Los antagonistas de producción de ácido graso también se pueden usar para influir en las proporciones de producción de aceite en plantas que producen aceite, incluyendo especies tanto transgénicas como de origen natural de incluyendo cultivos representativos tales como colza, linaza, soja y girasol. Algunos métodos de incorporación de dichos antagonistas incluyen, por ejemplo, riego en zonas que rodean a las plantas para incorporación en las plantas a través de su sistema radicular, adición como un principio activo en pulverizaciones para incorporación directa en las células de las plantas. Además también se puede considerar un método eficaz la inmersión directa, vaporización o inyección de estos compuestos en las células de la planta a través de cualquiera de los estomas o por vía subcutánea.

### 20 4. (1) Similitudes de secuencias

[0092] Como se discute en el presente documento, se entiende que el uso de los términos homología e identidad se refieren a lo mismo que similitud. Por lo tanto, por ejemplo, si el uso del término homología se usa entre dos secuencias no naturales, se entiende que no es necesario indicar una relación evolutiva entre estas dos secuencias, sino más bien buscar la similitud correlación entre secuencias de ácidos nucleicos. Muchos de los métodos para determinar la homología entre dos moléculas relacionadas en forma evolutiva se aplican de rutina a cualquiera de dos o más ácidos nucleicos o proteínas con la finalidad de medir la similitud de secuencias independientemente de de sí se relacionan o no de forma evolutiva.

[0093] En general, se entiende que una forma de definir cualquier variante y derivado conocido por los que pueden aparecer, de los genes y proteínas desvelados en el presente documento, es a través de la definición de las variantes y derivados en términos de homología con respecto a secuencias conocidas específicas. Esta identificación de secuencias en particular desveladas en el presente documento también se discute en cualquier parte en el presente documento. En general, las variantes de ácidos nucleicos y proteínas desveladas en el presente documento por lo general tienen una homología de aproximadamente un 50, 55, 60, 65, 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, o un 99 por ciento con respecto a la secuencia o la secuencia narrativa indicadas. Los expertos en la materia entienden rápidamente como determinar la homología de dos proteínas o ácidos nucleicos, tales como genes. Por ejemplo, la homología se puede calcular después del alineamiento de las consecuencias de modo que la homología se encuentra en su nivel más elevado.

40

[0094] Otra forma de calcular la homología puede ser con algoritmos publicados. El alineamiento óptimo de las secuencias para comparación se puede realizar con el algoritmo de homología local de Smith y Waterman Adv. Appl. Math. 2: 482, 1981, con el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970, con la búsqueda con el método de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444, 1988, con implementaciones informáticas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Paquete de Software de Genética de Wisconsin, Grupo de Informática Genética, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección.

[0095] Los mismos tipos de homología se pueden obtener parásitos nucleicos por ejemplo mediante los algoritmos desvelados en Zuker, M. Science 244: 48-52, 1989, Jaeger *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 7706-7710, 1989, Jaeger *et al.* Methods Enzymol. 183: 281-306, 1989. Se entiende que por lo general se puede usar cualquiera de los métodos y que, en ciertos casos, los resultados de estos diversos métodos pueden diferir, pero el experto en la materia entiende que si la identidad se encuentra con al menos uno de estos métodos, se diría que las secuencias tienen la identidad indicada, y se desvelan en el presente documento.

55

[0096] Por ejemplo, como se usa en el presente documento, una secuencia mencionada como con un porcentaje de homología en particular con respecto a otra secuencia se refiere a secuencias que tienen la homología mencionada tal como se calcula con uno cualquiera o más de los métodos de cálculo que se han descrito anteriormente. Por ejemplo, una primera secuencia tiene una homología de un 80 por ciento, como se define en el presente documento, con respecto a una segunda secuencia si la primera secuencia se calcula para que tenga una homología de un 80 por ciento por respuesta la segunda secuencia usando el método de cálculo Zuker incluso si la primera secuencia no tiene una homología de un 80 por ciento con respecto a la segunda secuencia tal como se calcula con cualquiera de los otros métodos de cálculo. Como otro ejemplo, una primera secuencia tiene una homología de un 80 por ciento, como se define en el presente documento, con respecto a una segunda secuencia si la primera secuencia se calcula para que tenga una homología de un 80 por ciento con respecto a la segunda secuencia usando tanto el método de

65

cálculo de Zuker como el método de cálculo de Pearson y Lipman incluso si la primera secuencia no tiene una homología de un 80 por ciento con respecto a la segunda secuencia como se calcula con el método de cálculo de Smith y Waterman, el método de cálculo de Needleman y Wunsch, el método de cálculo de Jaeger, o cualquiera de los otros métodos de cálculo. Aún con otro ejemplo, una primera secuencia tiene una homología de un 80 por ciento, como se define en el presente documento, con respecto a una segunda secuencia si la primera secuencia se calcula para que tenga una homología de un 80 por ciento con respecto a la segunda secuencia usando cada uno de los métodos de cálculo (aunque, en la práctica, los diferentes métodos de cálculo a menudo dan como resultado diferentes porcentajes de homología calculados).

## (2) Hibridación/hibridación selectiva

10

**[0097]** El término hibridación por lo general se refiere a una interacción dirigida por secuencia entre al menos dos moléculas de ácido nucleico, tal como un cebador o una sonda y un gen. Interacción dirigida por secuencia se refiere a una interacción que se produce entre dos nucleótidos o análogos de nucleótido o derivados de nucleótido de una manera específica del nucleótido. Por ejemplo, G que interacciona con C o A que interacciona con T son interacciones dirigidas por secuencia. Por lo general, las interacciones dirigidas por secuencia se producen en la cara de Watson-Crick o en la cara de Hoogsteen del nucleótido. La hibridación de los ácidos nucleicos se realiza mediante una serie de condiciones y parámetros conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, las concentraciones de sal, pH, y temperatura de la reacción todas influyen en sí se iniciarán dos moléculas de ácido nucleico.

20

**[0098]** Los expertos en la materia conocen bien los parámetros para hibridación selectiva entre dos moléculas de ácido nucleico. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las condiciones de hibridación selectivas se pueden definir como condiciones de hibridación rigurosas. Por ejemplo, la rigurosidad de la hibridación se controla tanto por la temperatura como por la concentración de sal de cualquiera o de ambas de las etapas de hibridación y de lavado.

25

Por ejemplo, las condiciones de hibridación para conseguir hibridación selectiva pueden implicar la hibridación en una solución de fuerza iónica elevada (SSC 6x o SSPE 6x) a una temperatura que es aproximadamente 12-25 °C inferior a la  $T_m$  (la temperatura de fusión a la que la mitad de las moléculas se disocian de sus asociados de hibridación) seguido de lavado a una combinación de temperatura y concentración de sal elegida de modo que la temperatura de lavado sea aproximadamente 5-20 °C inferior a la  $T_m$ . Las condiciones de temperatura y de sal se pueden determinar fácilmente de forma empírica en experimentos preliminares en los que las muestras de ADN de referencia inmovilizado en filtros se hibridan a algún ácido nucleico etiquetado de interés y a continuación se lavan en condiciones de diferente rigurosidad: las temperaturas de hibridación por lo general son más elevadas para hibridaciones de ADN-ARN y de ARN-ARN. Las condiciones se pueden usar como se ha descrito anteriormente para conseguir rigurosidad, o como se conoce en la técnica. (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>a</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989; Kunkel *et al.* Methods Enzymol. 154: 367, 1987. Una condición de hibridación rigurosa preferente para una hibridación de ADN:ADN puede ser a aproximadamente 68 °C (en solución acuosa) en SSC 6x o SSPE 6x seguido de lavado a 68 °C. La rigurosidad de la hibridación y del lavado, si se desea, se puede reducir en consecuencia a medida que el grado de complementariedad deseado disminuye, y adicionalmente, dependiendo de la riqueza de G-C o A-T de cualquier zona en la que se busca variabilidad. De forma análoga, la rigurosidad de la hibridación y del lavado, si se desea, se puede aumentar en consecuencia a medida que la homología deseada aumenta, y adicionalmente, dependiendo de la riqueza de G-C o A-T de cualquier zona en la que se desea homología elevada, todo como se sabe en la técnica.

40

**[0099]** Otra forma de definir la hibridación selectiva es mirando la cantidad (porcentaje) de uno de los ácidos nucleicos unido al otro ácido nucleico. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las condiciones de hibridación selectivas se deberían producir cuando al menos aproximadamente, 60, 65, 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 por ciento del ácido nucleico limitante está unido al ácido nucleico no limitante. Por lo general, el cebador no limitante está en un exceso de, por ejemplo, 10 o 100 o 1000 veces. Este tipo de ensayo se puede realizar en condiciones en las que tanto el cebador limitante como en una limitante están, por ejemplo, 10, 100 o 1000 veces por debajo de su  $k_d$ , o cuando solamente una de las moléculas de ácido nucleico es 10, 100 o 1000 veces o cuando una o ambas moléculas de ácido nucleico están por encima de su  $k_d$ .

50

**[0100]** Otra forma de definir la hibridación selectiva es mirando el porcentaje de cebado que se manipula de forma enzimática en condiciones en las que se requiere hibridación para estimular la manipulación enzimática deseada. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las condiciones de hibridación selectiva serían de al menos aproximadamente, 50, 55, 60, 65, 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 por ciento del cebado que se manipula de forma enzimática en condiciones que estimulan la manipulación enzimática, por ejemplo, si la manipulación enzimática es extensión de ADN, entonces las condiciones de hibridación selectiva serían aquellas en las que al menos aproximadamente 50, 55, 60, 65, 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 por ciento de las moléculas de cebador se extienden. Algunas condiciones preferentes también incluyen las sugeridas por el fabricante o las indicadas en la técnica como apropiadas para la realización de manipulación enzimática.

60

**[0101]** Al igual que con la homología, se entiende que en el presente documento existe una diversidad de métodos

65

desvelados para la determinación del nivel de hibridación entre dos moléculas de ácido nucleico. Se entiende que estos métodos y condiciones pueden proporcionar diferentes porcentajes de hibridación entre dos moléculas de ácido nucleico, pero, a menos que se indique de otro modo, satisfaciendo los parámetros de cualquiera de los métodos sería suficiente. Por ejemplo, si fuera necesaria una hibridación de un 80 % y siempre y cuando la hibridación se produzca dentro de los parámetros requeridos en cualquiera de estos métodos, se considera desvelada en el presente documento.

**[0102]** Se entiende que los expertos en la materia entienden que si una composición o método satisface uno cualquiera de estos criterios para la determinación de hibridación ya sea de forma colectiva o de forma individual, se trata de una composición o método que se desvela en el presente documento.

#### d) Composición de las moléculas producidas

**[0103]** Se entiende que los microbios que producen aceite desvelados en el presente documento son capaces de producir un número de compuestos y composiciones. Los compuestos y composiciones se pueden usar como una firma, una forma de identificar a los microbios que producen aceite. Por ejemplo, una forma de caracterización de un microbio productor de aceite es mediante el perfil lipídico que produce el microbio productor de aceite. Como se desvela en el presente documento, estos diversos perfiles lipídicos se pueden usar para caracterizar microbios que producen aceite así como para su purificación, manipulación, y recogida por una diversidad de razones.

##### (1) Lípidos

**[0104]** Se entiende que cada microbio productor de aceite puede producir algún perfil de ácidos grasos insaturados, como sedes de la en el presente documento. Estos perfiles son característicos de los microbios que producen aceite. A continuación se presentan algunos ejemplos de perfiles lipídicos insaturado y de otros lípidos para los microbios que producen aceite.

**[0105]** El microbio productor de aceite puede producir, por ejemplo, una fracción lipídica o de ácido graso de al menos aproximadamente un 4 % en peso a un 6 % en peso (por ejemplo, aproximadamente un 5 % en peso), que comprende de aproximadamente un 0 % en peso a aproximadamente un 2 % en peso de ácido mirístico (por ejemplo, aproximadamente un 1 % en peso), de aproximadamente un 16 % en peso a aproximadamente un 20 % en peso (por ejemplo, aproximadamente un 18 % en peso) de ácido palmítico, de aproximadamente un 0 % en peso a aproximadamente un 2 % en peso (por ejemplo, aproximadamente un 1 % en peso) ácido palmitoleico, de aproximadamente un 4 % en peso a aproximadamente un 8 % en peso (por ejemplo, aproximadamente un 6 % en peso) de ácido esteárico, de aproximadamente un 30 % en peso a aproximadamente un 34 % en peso (por ejemplo, aproximadamente un 32 % en peso) de ácido oleico, de aproximadamente un 40 % en peso a aproximadamente un 44 % en peso (por ejemplo, aproximadamente un 42 % en peso) de ácido linoleico, y de aproximadamente un 0 % en peso a aproximadamente un 3 % en peso (por ejemplo, aproximadamente un 2 % en peso) de EPA n-3 por biomasa celular seca.

**[0106]** El microbio productor de aceite también puede producir, por ejemplo, a una fracción lipídica o de ácido graso de al menos aproximadamente un 1 % en peso a un 3 % en peso (por ejemplo, aproximadamente un 1,25 % en peso), que comprende de aproximadamente un 2 % en peso a aproximadamente un 4 % en peso (por ejemplo, aproximadamente un 3 % en peso) de ácido mirístico, de aproximadamente un 50 % en peso a aproximadamente un 60 % en peso (por ejemplo, aproximadamente un 55 % en peso) de ácido palmítico, de aproximadamente un 2 % en peso a aproximadamente un 4 % en peso (por ejemplo, aproximadamente un 3 % en peso) de ácido palmitoleico, de aproximadamente un 16 % en peso a aproximadamente un 20 % en peso (por ejemplo, aproximadamente un 18 % en peso) de ácido esteárico, de aproximadamente un 9 % en peso a aproximadamente un 13 % en peso (por ejemplo, aproximadamente un 11 % en peso) de ácido oleico, de aproximadamente un 1 % en peso a aproximadamente un 3 % en peso (por ejemplo, aproximadamente un 2 % en peso) de ácido eicosadienoico, y de aproximadamente un 6 % en peso a aproximadamente un 10 % en peso (por ejemplo, aproximadamente un 8 % en peso) de EPA n-3 por biomasa celular seca.

**[0107]** El microorganismo eucariota, por ejemplo, tal como ONC-T18, puede producir al menos aproximadamente un 30 % en peso, un 40 % en peso, un 50 % en peso, un 60 % en peso, un 70 % en peso o un 80 % en peso (por ejemplo, aproximadamente un 80 % en peso) de una composición lipídica por biomasa celular seca. Por ejemplo, el microbio productor de aceite puede producir una composición lipídica que comprende de aproximadamente un 25 % a aproximadamente un 40 % de un ácido graso omega-3, tal como DHA n-3, (por ejemplo, al menos un 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 % o un 60 % en peso), y de aproximadamente un 0 % a aproximadamente un 3 % del ácido graso omega-3, EPA, (por ejemplo, al menos un 1 % o un 2 % en peso) y de aproximadamente un 4 % a aproximadamente un 12 % de un ácido graso omega-6, tal como DPA n-6, (por ejemplo, al menos un 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, o un 10 % en peso).

**[0108]** Se entiende que la composición del lípido producido por el microbio productor de aceite se pueden manipular basándose en las condiciones de crecimiento en las que se multiplica el microbio productor de aceite. Cambiando

diversos parámetros, como se desvela en el presente documento, las composiciones se pueden manipular para producir, por ejemplo, un mejor rendimiento de DHA, EPA o DPA. Por ejemplo, la manipulación puede no producir más gramos reales, pero la manipulación puede producir una mejor proporción de DHA o DPA con respecto a EPA y otros PUFA deseados, que debe ser deseable desde un punto de vista de la purificación. Algunas condiciones variables que se pueden usar para aumentar el rendimiento de DHA, EPA o DPA también se discuten en el presente documento.

**[0109]** Se entiende que la composición del lípido producido por el microbio productor de aceite se pueden manipular basándose en la composición del medio de crecimiento en la que se multiplica el microbio productor de aceite. Cambiando tanto las proporciones como los tipos de fuentes de carbono con respecto a nitrógeno, la composición química de la salud usada y mediante la adición de ciertos compuestos químicos que influyen en la producción de ácido graso, se pueden producir perfiles de ácido grado específico similares a los de los aceites de pescados seleccionados. Por ejemplo, la manipulación puede no producir más gramos reales, pero la manipulación puede producir un perfil de TFA similar al de, por ejemplo, aceite de hígado de bacalao, aceite de atún o de bonito o aceite de pescado a 18:12 clásico.

**[0110]** En el presente documento se desvelan métodos para alterar las proporciones de ácido graso producido por microbios que producen aceite complementando la composición del medio de crecimiento en la que se multiplica el microbio productor de aceite con uno o más antagonistas de producción de ácido graso. Las proporciones de ácido graso se pueden alterar con o sin alteración del contenido total de ácido graso del microbio productor de aceite. Por ejemplo, la proporción de aceites omega n-3 y/o n-6 con respecto a aceites omega n-9 se puede aumentar complementando el medio de un microbio productor de aceite con un antagonista de producción de ácido graso.

**[0111]** También se desvelan métodos para alterar las proporciones de ácido graso producidas por los microbios que producen aceite sin alterar el contenido total de ácido graso del microbio productor de aceite, complementando en la composición del medio de crecimiento en el que se multiplica el microbio productor de aceite con uno o más antagonistas de producción de ácido graso.

**[0112]** La Figura 1 muestra un ejemplo de una ruta metabólica para los diversos PUFA producidos por el microorganismo eucariota desvelado, coherente con el seguimiento del metabolitos de éster de metilo del ácido graso. Algunas proteínas que se pueden identificar dentro de las rutas que, como se desvela en el presente documento, son la policétido sintasa, usando por ejemplo, un primer estudio degenerativo, (Metz *et al.* (2001) Science 293: 290-3 y Kaulmann y Hertweck (2002) Angew. Chem. Int. Ed. 41: 1866-9). También se pueden identificar algunas elongasas y desaturasas, usando por ejemplo una sonda de hibridación y/o cebadores degenerativos o dirigidos. También se pueden identificar algunas ácido graso sintasas usando, por ejemplo, una sonda de hibridación y/o un cebador degenerativo.

## 5. Crecimiento y cultivo

**[0113]** Se realizó un estudio fenotípico en microplaca que incluía carbono; nitrógeno (nitrógeno peptídico); fósforo y azufre; osmolitos, y pH.

**[0114]** Se usó un método de matriz ortogonal (Taguchi) para determinar las configuraciones de los medios y variaciones óptimas en la concentración de nitrógeno, carbono y sal (Joseph J y Piganatiells JR (1998) IIE Trans, 20: 247-254).

**[0115]** Cuando se fermenta ONC-T18, se encontró que si se aumenta la agitación o el  $dO_2$ , se aumenta la producción de biomasa y de TFA pero disminuye la de DHA. Si se disminuye la agitación o el  $dO_2$ , disminuye la biomasa celular (g) y disminuye TFA pero aumenta DHA y también se reduce C16:0, C16:1 y C18:1.

**[0116]** Si se aumenta la temperatura, se aumenta la producción de biomasa y de TFA pero disminuye DHA. Si se disminuye la temperatura, disminuye la biomasa celular (g) y disminuye TFA pero aumenta DHA, pero se reduce C16:0, C16:1 y C18:1.

**[0117]** La biomasa celular derivada del microbio productor de aceite desvelado se puede obtener por inoculación de un medio de agua marina natural o artificial, que contiene de aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 100 % de agua marina. Este microbio productor de aceite es capaz de usar diversos componentes nutricionales dentro de este medio. Algunos ejemplos de una fuente de carbono usadas dentro del medio son carbohidratos tales como glucosa, fructosa, dextrosa, lactulosa, galactosa, maltotriosa, maltosa, lactosa, glicógeno, gelatina, almidón (de maíz o trigo) así como derivados de azúcar tales como acetato, m-inositol (derivado de agua de macerado de maíz), ácido galacturónico (derivado de pectina), L-fucosa (derivada de galactosa), gentiobiosa, glucosamina,  $\alpha$ -D-glucosa-1-fosfato (derivado de glucosa), celobiosa (derivada de celulosa), dextrina (derivada de maíz) y  $\alpha$ -ciclodextrina (derivada de almidón) y polioles tales como maltitol, eritritol, adonitol y ácidos oleicos tales como glicerol y Tween 80 y amino azúcares tales como N-acetil-D-galactosamina, N-acetil-D-glucosamina y N-acetil- $\beta$ -D-manosamina. Aunque algunos ejemplos de una fuente de nitrógeno son fuentes de nitrógeno natural tales como peptona, extracto de

levadura, extracto de malta y harina de pescado, o una fuente de nitrógeno orgánico tal como glutamato sódico, pero no se limitan a los mismos. Además, si fuera necesario, como nutrientes traza se pueden usar fosfatos, tales como fosfato potásico, y fosfato sódico, sales inorgánicas tales como sulfato de amonio, bicarbonato sódico, ortovanadiato sódico, bromato potásico, molibdato sódico, ácido selenioso, sulfato de níquel, sulfato de cobre, sulfato de cinc, cloruro de cobalto, cloruro de hierro, cloruro de manganeso y cloruro cálcico, en combinación con el compuesto de quelación, ácido etilendiamintetraacético, sólo o en combinación con vitaminas tales como clorhidrato de piridoxina, clorhidrato de tiamina, pantotenato cálcico, ácido p-aminobenzoico, riboflavina, ácido nicotínico, biotina, ácido fólico y vitamina B<sub>12</sub>. Después de preparar el medio, el pH se ajusta entre 3,0 y 10,0 usando ácido o base para ajustar, cuando sea apropiado, por ejemplo entre pH 4,0 y 6,5, y el medio se esteriliza en autoclave, por ejemplo. El cultivo se puede realizar de 1 a 30 días, de 1 a 21 días, de 1 a 15 días, de 1 a 12 días, de 1 a 9 días, o preferentemente de 3 a 5 días a temperaturas entre 4 y 30 °C, preferentemente de 18 a 28 °C, mediante cultivo con aireación-agitación, cultivo con agitación, cultivo estacionario, cultivo discontinuo, cultivo continuo, cultivo discontinuo o centrifugación, o cultivo ondulatorio, o similares.

15 **[0118]** Las siguientes condiciones son un ejemplo de condiciones que pueden permitir la producción de un conjunto de lípidos con rendimientos que permitan su uso con comodidad. La investigación de las condiciones de cultivo para ONC-T18 revelaron que el microbio productor de aceite desvelado en el presente documento crece bien en agua de mar natural o artificial o en un medio que contiene una concentración inferior a un 5 % de agua de mar natural o artificial. Algunas fuentes de carbono y nitrógeno añadidas al medio pueden ser las usadas convencionalmente como se ha descrito anteriormente. La fuente de nitrógeno ya sea de naturaleza natural u orgánica es relativamente igual y la concentración total de nitrógeno dentro del medio se mantiene constante. Estas fuentes se añaden al medio en concentraciones estándar. Si estas condiciones se satisfacen, se produce poca influencia del contenido de lípido, proporciones o la cantidad de DHA, DPA y EPA acumulados, como se desvela en el presente documento.

25 **[0119]** Para fermentación de concentración elevada de ONC-T18, es posible usar varios métodos para aumentar las tasas tanto de biomasa celular como de producción de lípido. Estos incluyen, el aumento de la concentración tanto de carbono, nitrógeno en el medio (a una proporción entre 6:1 y 15:1, preferentemente entre 6:1 y 13:1 y a temperaturas entre 4 y 30 °C, preferentemente de 18 a 28 °C) desde el intervalo de 5 g l<sup>-1</sup> a 60 g l<sup>-1</sup> hasta el intervalo de 100 g l<sup>-1</sup> y 160 g l<sup>-1</sup> y desde el intervalo de 4 g l<sup>-1</sup> a 10 g l<sup>-1</sup> hasta el intervalo de 40 g l<sup>-1</sup> a 60 g l<sup>-1</sup>, respectivamente.

30 Usando este método, la proporción de biomasa y lípido producidos también aumenta a tasas comparables. Además, es posible aumentar la producción de lípido a través del uso de aumento de fuentes de carbono desde el intervalo de 5 g l<sup>-1</sup> a 60 g l<sup>-1</sup> hasta el intervalo de 100 g l<sup>-1</sup> y 160 g l<sup>-1</sup>, mientras que la fuente de nitrógeno permanece constante. Además, es posible aumentar la producción de biomasa a la vez que se mantiene el contenido de lípido, a través del uso de cantidades crecientes de fuentes de nitrógeno desde el intervalo de 10 g l<sup>-1</sup> a 60 g l<sup>-1</sup> mientras que la fuente de carbono permanece constante. Además, la experimentación ha determinado que la producción de biomasa y lípido aumenta en gran medida con el aumento de la agitación desde el intervalo de 100 y 1000 rpm, mejor entre 350 y 600 rpm y de forma óptima entre 350 y 450 rpm, con solamente una disminución mínima del contenido de lípido y ninguna disminución de los perfiles de ácido graso, con agitación particularmente relevante en las etapas iniciales de fermentación heterotrófica. La experimentación también ha determinado que la producción óptima del lípido se consigue cuando el contenido de oxígeno disuelto del medio de cultivo se mantiene entre 1 y 10 %, de forma óptima a un 5 % durante la etapa de acumulación del lípido de la fermentación semicontinua clásica de estos microorganismos (véase la Figura 8). Por último, la adición de acetato, elementos traza, metales y vitaminas al medio de producción (como se ha mencionado anteriormente) aumenta la producción de DHA, EPA y DPA con respecto a otros ácidos grasos sin disminuir los valores totales de lípido.

45 **[0120]** Realizando la fermentación heterotrófica como se ha descrito anteriormente, es posible producir biomasa celular de forma coherente que produce un lípido que contiene la serie (n-3) de DHA en un cultivo de alta concentración de no menos de 5 g y más preferentemente no menos de 20 g/l de medio (véase la Figura 8). Además, la experimentación ha mostrado que la mayoría de estos lípidos se acumulan durante las etapas exponencial/de transición posteriores de cultivo, después de que se hayan alcanzado los niveles máximos de biomasa. Además, durante el proceso de fermentación, el contenido del lípido por lo general no se incluye por debajo de un 25 % de la biomasa total, por lo general maximizándose a aproximadamente un 80 %. El cultivo en las condiciones mencionadas anteriormente se puede realizar usando un fermentador de agitación convencional. También es posible usar fermentador de columna de burbujas (cultivos discontinuos o continuos), o un fermentador ondulatorio.

60 **[0121]** La recogida de biomasa celular antes de su procesamiento para separación del lípido se puede realizar usando diversos métodos convencionales tales como centrifugación (tal como centrifugas de eyección de sólido) o filtración (tal como filtración de flujo cruzado) y también pueden incluir el uso de un agente de precipitación para la recogida acelerada de la biomasa celular (tal como fosfato sódico, cloruro cálcico o poliacridamida).

#### a) Antagonistas de la Producción de Ácido Graso

65 **[0122]** El medio usado para cultivar los microbios que producen aceite desvelados también puede comprender antagonistas de producción de ácido graso. Los antagonistas de la producción de ácido graso pueden ser

subunidades de ácido graso o moduladores de la ruta de ácido graso. Por ejemplo, algunos antagonistas de producción de ácido graso incluyen, pero no se limitan, ácido oleico, cerulenina, ácido toluico, curcumina, ciclopropeno, galato de alquilo, galato de propilo, aceite de sésamo, aceite de cacahuete, aceite de colza, piperidazina, norflurazón, difenilamina, setoxidim, y capsaicina.

5

**[0123]** Las expresiones "subunidad de ácido graso" o "subunidades de ácido graso", como se usan en el presente documento, se refieren a los ácidos grasos de 16, 18, 20, 22 o 24 carbonos implicados en la ruta metabólica para la producción de los PUFA por los microbios que producen aceite desvelados. Por ejemplo, las "subunidades de ácido graso" pueden incluir cualquiera de los ácidos grasos de 16, 18, 20, 22 o 24 carbonos que se muestran en la Figura

10 1.

**[0124]** Una "subunidad de ácido graso" también se puede usar en el presente documento para hacer referencia a cualquier ácido graso de 16, 18, 20, 22 o 24 carbonos que tienen 1, 2, 3, 4, 5 o 6 y saturaciones implicadas en la ruta metabólica para la producción de los PUFA por los microbios que producen aceite desvelados. Además, algunas realizaciones pueden incluir números impares de carbonos en el ácido graso, con o sin insaturaciones tales como ácidos grasos de 15, 17, 19 y 21 carbonos encontrados dentro de organismos marinos.

15

**[0125]** Los moduladores de la ruta de ácido graso pueden ser compuestos capaces de inhibir una o más de las enzimas implicadas en la ruta metabólica para la producción de los PUFA por los microbios que producen aceite desvelados. La inhibición de una o más de las enzimas implicadas en la ruta metabólica para la producción de los PUFA por los microbios que producen aceite desvelados puede ser una inhibición, a menos que se indique de otro modo, de al menos un 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 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, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o un 100 %.

20

**[0126]** Un modulador de la ruta de ácido graso puede ser un compuesto capaz de inhibir una o más de las desaturasas o elongasas implicadas en la ruta metabólica para la producción de los PUFA por los microbios que producen aceite desvelados. Los moduladores de la ruta de ácido graso también pueden ser compuestos capaces de inhibir las fitona desaturasas,  $\beta$ -caroteno C4-oxigenasas, ácido graso sintasas o acetil CoA carboxilasas de los microbios que producen aceite desvelados.

25

30

## 6. Aislamiento de Lípido

**[0127]** La Figura 2 muestra un perfil general de ácido graso para un microbio productor de aceite desvelado. Las Figuras 5-7 muestran contenido de biomasa (g/l), lípido (TFA) y DHA (todos en mg/g de biomasa) como una función de la fermentación en matraces de agitación en una diversidad de fuentes de nitrógeno tanto de forma individual como en presencia de L-glutamato o extracto de levadura (YE), fuentes de carbono (de forma individual) o cultivos suplementados (es decir, además de las fuentes tanto de nitrógeno como de carbono mencionadas por toda la memoria descriptiva) con diversos antioxidantes, fitohormonas o fuentes de carbono sencillas. Todos estos datos se pueden usar para extraer características específicas sobre los microbios que producen los aceites desvelados.

35

40

**[0128]** El contenido de grasa de la serie (n-3) de DHA, DPA, EPA y de la serie (n-6) de DPA se puede obtener mediante la ruptura o alteración de la biomasa celular recogida, por ejemplo, a través de molienda, ultrasonificación, y realizando a continuación la extracción con un disolvente tal como cloroformo, hexano, metanol, etanol o a través de medios de extracción con fluido supercrítico. El contenido de la masa resultante que contiene la serie (n-3) de DHA y la serie (n-6) de DPA por gramo de biomasa celular seca es preferentemente superior a 0,25 g y más preferentemente superior a 0,6 g.

45

**[0129]** Los microbios que producen aceite desvelados, incluyendo el microbio productor de aceite, ONC-T18, son capaces de producir lípido obtenido de este modo, cualquiera de sus variantes y cualquier asociación entre miembros de la misma especie de microorganismos eucariotas con lo que el perfil lipídico es como sigue a continuación. El porcentaje de lípidos neutros puede ser de al menos un 95 % en peso de los lípidos totales. Por ejemplo, la composición de ácidos grasos habitual para ONC-T18, en los lípidos neutros como sigue a continuación: 15 % de ácido mirístico, 8 % de ácido pentadecanoico, 35 % de ácido palmítico, 7 % de ácido palmitoleico, 1 % de ácido esteárico, 2 % de ácido oleico, 1 % de ácido eicosapentaenoico, 6 % de ácido docosapentaenoico y un 25 % de ácido docosahexaenoico. Después del suplemento del medio con uno o más antagonistas de producción de ácido graso, la proporción total de aceites omega n-3 y omega n-6 tales como ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentaenoico y ácido docosapentaenoico (tanto n-3 como n-6) con respecto a los aceites omega n-9 tales como ácido esteárico se puede aumentar. Por ejemplo, la Figura 11 muestra cambios posibles en la proporción de aceites omega n-3 y omega n-6 en comparación con un control en el que un antagonista de producción de ácido graso no se añade al medio. Otros ejemplos se pueden observar en las Figuras 12-15.

50

55

60

**[0130]** Los microbios que producen aceite desvelados, tales como ONC-T18, son capaces de producir lípido obtenido de este modo, cualquiera de sus variantes y cualquier asociación entre miembros de la misma especie de microorganismos eucariotas por lo que el perfil lipídico es como sigue a continuación. El porcentaje de mono, di y triglicéridos en la fracción lipídica neutra de ONC-T18 es de un 0 % a aproximadamente un 2 %, de un 0 % a

65

aproximadamente un 2 % y de un 96 % a aproximadamente un 100 %, respectivamente. Cuando la fracción lipídica polar comprende entre un 5 % y aproximadamente un 10 % de la fracción lipídica, entonces comprende fosfatidilcolina, fosfatidilserina y ácido fosfatídico tanto unidos como no unidos a lípidos neutros.

- 5 **[0131]** Se entiende que estos lípidos se pueden encontrar en cualquier combinación o permutación dentro del organismo. También se entiende que las concentraciones de estos lípidos se pueden manipular cambiando las condiciones de crecimiento y las condiciones y composiciones del medio como se discute en el presente documento.

#### (1) Lípido como concentración

10

**[0132]** Los microbios que producen aceite desvelados pueden producir una fracción lipídica que comprende DHA n-3, EPA y DPA n-6 en una cantidad superior o igual a aproximadamente  $4,0 \text{ g l}^{-1}$  de medio. Los microbios que producen aceite desvelados pueden producir una composición lipídica que comprende DHA n-3, EPA y DPA n-6 en una cantidad superior o igual a aproximadamente  $20,0 \text{ g l}^{-1}$  de medio. Los microbios que producen aceite desvelados pueden producir una composición lipídica que comprende DHA n-3, EPA y DPA n-6 en una cantidad superior o igual a aproximadamente  $140 \text{ g l}^{-1}$  de medio. Los microbios que producen aceite desvelados pueden producir de aproximadamente  $1,5 \text{ g l}^{-1}$  a aproximadamente  $5,0 \text{ g l}^{-1}$  (por ejemplo, aproximadamente  $4,6 \text{ g l}^{-1}$ ) del DHA n-3, de aproximadamente  $0,5 \text{ g l}^{-1}$  a aproximadamente  $1,5 \text{ g l}^{-1}$  (por ejemplo, aproximadamente  $0,22 \text{ g l}^{-1}$ ) del EPA n-3, y de aproximadamente  $0,5 \text{ g l}^{-1}$  a aproximadamente  $1,5 \text{ g l}^{-1}$  del DPA n-6. Además, los microbios que producen aceite desvelados pueden producir una fracción lipídica que comprende los ácidos mirístico, miristoleico, pentadecanoico, palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico, linoleico, eicosadienoico, araquidónico, eicosapentaenoico, docosahexanoico y docosapentaenoico entre  $301,2 \text{ mg g}^{-1}$  y  $360,3 \text{ mg g}^{-1}$  o incluso hasta  $790 \text{ mg g}^{-1}$  de biomasa celular. Los microbios que producen aceite desvelados también pueden producir una fracción que comprende entre  $44,3 \text{ mg g}^{-1}$  y  $57 \text{ mg g}^{-1}$  de ácido mirístico (de igual a  $1134,5 \text{ mg l}^{-1}$  a  $1458,1 \text{ mg l}^{-1}$ ), de  $0,5 \text{ mg g}^{-1}$  a  $0,65 \text{ mg g}^{-1}$  de ácido miristoleico (de igual a  $13,3 \text{ mg l}^{-1}$  a  $16,63 \text{ mg l}^{-1}$ ), de  $33,5 \text{ mg g}^{-1}$  a  $34,6 \text{ mg g}^{-1}$  de ácido pentadecanoico (de igual a  $856,9 \text{ mg l}^{-1}$  a  $885,1 \text{ mg l}^{-1}$ ), entre  $121,9 \text{ mg g}^{-1}$  y  $165,1 \text{ mg g}^{-1}$  de ácido palmítico (de igual a  $3118,2 \text{ mg l}^{-1}$  a  $4223,3 \text{ mg l}^{-1}$ ), de  $7,9 \text{ mg g}^{-1}$  a  $28,5 \text{ mg g}^{-1}$  de ácido palmitoleico (de igual a  $202,1 \text{ mg l}^{-1}$  a  $729 \text{ mg l}^{-1}$ ), de  $4,38 \text{ mg g}^{-1}$  a  $5,9 \text{ mg g}^{-1}$  de ácido esteárico (de igual a  $112 \text{ mg l}^{-1}$  a  $151 \text{ mg l}^{-1}$ ), de  $6,94 \text{ mg g}^{-1}$  a  $9,9 \text{ mg g}^{-1}$  de ácido oleico (de igual a  $177,5 \text{ mg l}^{-1}$  a  $253,2 \text{ mg l}^{-1}$ ), de  $0,4 \text{ mg g}^{-1}$  a  $1,3 \text{ mg g}^{-1}$  de ácido linoleico (de igual a  $11,26 \text{ mg l}^{-1}$  a  $33,3 \text{ mg l}^{-1}$ ), de  $0,5 \text{ mg g}^{-1}$  a  $1,0 \text{ mg g}^{-1}$  de ácido eicosadienoico (de igual a  $12,8 \text{ mg l}^{-1}$  a  $25,6 \text{ mg l}^{-1}$ ), de  $0,4 \text{ mg g}^{-1}$  a  $0,5 \text{ mg g}^{-1}$  de ácido araquidónico (de igual a  $10,2 \text{ mg l}^{-1}$  a  $13 \text{ mg l}^{-1}$ ), de  $75 \text{ mg g}^{-1}$  a  $100 \text{ mg g}^{-1}$  de ácido docosahexanoico (de igual a  $1918 \text{ mg l}^{-1}$  a  $2560 \text{ mg l}^{-1}$ ), de  $1,9 \text{ mg g}^{-1}$  a  $6 \text{ mg g}^{-1}$  de ácido eicosapentaenoico (de igual a  $48,6 \text{ mg l}^{-1}$  a  $153,5 \text{ mg l}^{-1}$ ) y de  $17,1 \text{ mg g}^{-1}$  a  $33,7 \text{ mg g}^{-1}$  de ácido docosapentaenoico (de igual a  $437,4 \text{ mg l}^{-1}$  a  $862,1 \text{ mg l}^{-1}$ ), con un contenido total de ácido graso total dentro de la biomasa celular entre  $301 \text{ mg g}^{-1}$  y  $790 \text{ mg g}^{-1}$  (de igual a  $7700 \text{ mg l}^{-1}$  a  $20,209 \text{ mg l}^{-1}$ ).

**[0133]** Lípido como porcentaje de ácido graso total: la presencia del antagonista de producción de ácido graso, setoxidim, puede cambiar la composición del ácido graso por ejemplo, de un 11,27 % a un 10,97 % de ácido mirístico, de un 0,23 % a un 0,03 % de ácido miristoleico, de un 3,92 % a un 5,5 % de ácido pentadecanoico, de un 0,43 % a un 0,53 % de ácido pentadecenoico, de un 45,57 % a un 40,52 % de ácido palmítico, de un 11,63 % a un 9,18 % de ácido palmitoleico, de un 1,16 % a un 1,49 % de ácido margárico, de un 1,84 % a un 1,45 % de ácido esteárico, de un 0,00 % a un 0,18 % de ácido oleico, de un 2,89 % a un 2,48 % de ácido vaccénico, de un 0,36 % a un 0,2 % de ácido araquidónico, de un 0,12 % a un 0,00 % de ácido eicosenoico, de un 0,38 % a un 0,14 % de ácido eicosadienoico, de un 0,14 % a un 0,10 % de ácido homo-gamma-linoléico, de un 0,13 % a un 0,20 % de ácido araquidónico, queda un 0,00 % de ácido eicosatrienoico, de un 0,26 % a un 0,37 % de ácido eicosatetraenoico, de un 0,38 % a un 0,78 % de ácido eicosapentaenoico, queda un 0,00 % de ácido behénico, de un 1,12 % a un 1,09 % de ácido heneicosapentaenoico, de un 0,20 % a un 0,00 % de ácido docosadienoico, de un 0,16 % a un 0,00 % de ácido adrénico, de un 3,88 % a un 5,26 % de n-6 ácido docosapentaenoico, de un 0,35 % a un 0,24 % de n-3 ácido docosapentaenoico, queda un 0,00 % de ácido lignocérico, de un 13,54 % a un 19,31 % de ácido docosahexanoico, queda un 0,00 % de ácido nervónico, y de un 0,27 % a un 0,20 % de ácido hexacosanoico.

**[0134]** Lípido como porcentaje de ácido graso total: la presencia del antagonista de producción de ácido graso, cerulenina, puede cambiar la composición del ácido graso por ejemplo, de un 11,10 % a un 11,03 % de ácido mirístico, queda un 0,00 % de ácido miristoleico, de un 3,84 % a un 3,23 % de ácido pentadecanoico, de un 0,11 % a un 0,10 % de ácido pentadecenoico, de un 50,52 % a un 48,98 % de ácido palmítico, de un 1,93 % a un 2,22 % de ácido palmitoleico, de un 0,85 % a un 0,74 % de ácido margárico, de un 1,55 % a un 1,86 % de ácido esteárico, de un 0,13 % a un 0,29 % de ácido oleico, de un 0,93 % a un 1,24 % de ácido vaccénico, de un 0,38 % a un 0,41 % de ácido araquidónico, de un 0,00 % a un 0,19 % de ácido eicosenoico, queda un 0,17 % de ácido eicosadienoico, de un 0,15 % a un 0,20 % de ácido homo-gamma-linoléico, de un 0,16 % a un 0,30 % de ácido araquidónico, queda un 0,00 % de ácido eicosatrienoico, de un 0,34 % a un 0,36 % de ácido eicosatetraenoico, de un 0,72 % a un 1,17 % de ácido eicosapentaenoico, de un 0,10 % a un 0,11 % de ácido behénico, de un 1,27 % a un 1,24 % de ácido heneicosapentaenoico, de un 0,13 % a un 0,14 % de ácido docosadienoico, queda un 0,00 % de ácido adrénico, de un 5,47 % a un 5,83 % de n-6 ácido docosapentaenoico, de un 0,16 % a un 0,23 % de n-3 ácido docosapentaenoico, queda un 0,00 % de ácido lignocérico, de un 19,98 % a un 19,97 % de ácido docosahexanoico acid, queda un 0,00 % de ácido nervónico, y de un 0,16 % a un 0,23 % de ácido hexacosanoico.

**[0135]** Lípido como porcentaje de ácido graso total: la presencia del antagonista de producción de ácido graso, ácido oleico, puede cambiar la composición del ácido graso por ejemplo, de un 24,46 % a un 1,38 % de ácido mirístico, de un 0,03 % a un 0,00 % de ácido miristoleico, de un 2,43 % a un 0,49 % de ácido pentadecanoico, queda un 0,00 %  
 5 de ácido pentadecenoico, de un 42,82 % a un 16,67 % de ácido palmítico, de un 0,46 % a un 1,06 % de ácido palmitoleico, de un 0,31 % a un 0,28 % de ácido margárico, de un 1,26 % a un 1,56 % de ácido esteárico, de un 0,15 % a un 25,36 % de ácido oleico, de un 0,26 % a un 2,68 % de ácido vaccénico, de un 0,36 % a un 0,00 % de ácido araquídico, queda un 0,00 % de ácido eicosenoico, de un 0,06 % a un 0,51 % de ácido eicosadienoico, de un 0,13 % a un 0,61 % de ácido homo-gamma-linolénico, de un 0,22 % a un 0,72 % de ácido araquidónico, queda un  
 10 0,00 % de ácido eicosatrienoico, de un 0,27 % a un 0,00 % de ácido eicosatetraenoico, de un 0,62 % a un 5,47 % de ácido eicosapentaenoico, de un 0,10 % a un 0,00 % de ácido behénico, de un 1,01 % a un 0,20 % de ácido heneicosapentaenoico, de un 0,14 % a un 0,68 % de ácido docosadienoico, de un 0,14 % a un 0,60 % de ácido adrénico, de un 5,85 % a un 7,58 % de n-6 ácido docosapentaenoico, de un 0,14 % a un 0,39 % de n-3 ácido docosapentaenoico, queda un 0,00 % de ácido lignocérico, de un 18,77 % a un 33,16 % de ácido  
 15 docosahexaenoico, queda un 0,00 % de ácido nervónico, y queda un 0,00 % de ácido hexacosanoico.

**[0136]** Lípido como porcentaje de ácido graso total: la presencia del antagonista de producción de ácido graso, ácido oleico en combinación con glucosa, puede cambiar la composición del ácido graso por ejemplo, de un 24,46 % a un 8,04 % de ácido mirístico, de un 0,03 % a un 0,00 % de ácido miristoleico, de un 2,43 % a un 0,73 % de ácido  
 20 pentadecanoico, queda un 0,00 % de ácido pentadecenoico, de un 42,82 % a un 33,18 % de ácido palmítico, de un 0,46 % a un 4,22 % de ácido palmitoleico, de un 0,31 % a un 0,17 % de ácido margárico, de un 1,26 % a un 1,60 % de ácido esteárico, de un 0,15 % a un 9,49 % de ácido oleico, de un 0,26 % a un 4,45 % de ácido vaccénico, de un 0,36 % a un 0,34 % de ácido araquídico, de un 0,00 % a un 0,30 % de ácido eicosenoico, de un 0,06 % a un 0,36 % de ácido eicosadienoico, de un 0,13 % a un 0,30 % de ácido homo-gamma-linolénico, de un 0,22 % a un 0,46 % de  
 25 ácido araquidónico, queda un 0,00 % de ácido eicosatrienoico, de un 0,27 % a un 0,24 % de ácido eicosatetraenoico, de un 0,62 % a un 2,60 % de ácido eicosapentaenoico, de un 0,10 % a un 0,00 % de ácido behénico, de un 1,01 % a un 0,79 % de ácido heneicosapentaenoico, de un 0,14 % a un 0,43 % de ácido docosadienoico, de un 0,14 % a un 0,28 % de ácido adrénico, de un 5,85 % a un 6,46 % de n-6 ácido docosapentaenoico, de un 0,14 % a un 0,39 % de n-3 ácido docosapentaenoico, queda un 0,00 % de ácido  
 30 lignocérico, de un 18,77 % a un 24,65 % de ácido docosahexaenoico, queda un 0,00 % de ácido nervónico, y queda un 0,00 % de ácido hexacosanoico.

**[0137]** Lípido como porcentaje de ácido graso total: la presencia del antagonista de producción de ácido graso, capsaicina, puede cambiar la composición del ácido graso por ejemplo, de un 9,7 % a un 21,86 % de ácido mirístico, de un 0,00 % a un 0,28 % de ácido miristoleico, de un 9,83 % a un 0,91 % de ácido pentadecanoico, de un 0,11 % a un  
 35 0,23 % de ácido pentadecenoico, de un 43,48 % a un 24,19 % de ácido palmítico, de un 1,52 % a un 17,98 % de ácido palmitoleico, de un 2,29 % a un 0,19 % de ácido margárico, de un 1,59 % a un 1,60 % de ácido esteárico, de un 0,10 % a un 0,00 % de ácido oleico, de un 1,27 % a un 6,67 % de ácido vaccénico, de un 0,26 % a un 0,20 % de ácido araquídico, queda un 0,00 % de ácido eicosenoico, de un 0,03 % a un 0,23 % de ácido eicosadienoico, de un  
 40 0,25 % a un 0,22 % de ácido homo-gamma-linolénico, de un 0,17 % a un 0,78 % de ácido araquidónico, queda un 0,00 % de ácido eicosatrienoico, de un 0,30 % a un 0,27 % de ácido eicosatetraenoico, de un 0,48 % a un 1,38 % de ácido eicosapentaenoico, de un 0,08 % a un 0,00 % de ácido behénico, de un 0,00 % a un 0,00 % de ácido heneicosapentaenoico, de un 0,13 % a un 0,17 % de ácido docosadienoico, de un 0,07 % a un 0,46 % de ácido adrénico, de un 6,53 % a un 5,19 % de n-6 ácido docosapentaenoico, de un 0,22 % a un 0,31 % de n-3 ácido  
 45 docosapentaenoico, queda un 0,00 % de ácido lignocérico, de un 21,48 % a un 16,86 % de ácido docosahexaenoico, queda un 0,00 % de ácido nervónico, y queda un 0,00 % de ácido hexacosanoico.

**[0138]** Lípido como porcentaje de ácido graso total: la presencia del antagonista de producción de ácido graso, ácido toluico, puede cambiar la composición del ácido graso por ejemplo, de un 8,95 % a un 11,19 % de ácido mirístico, queda un 0,00 % de ácido miristoleico, de un 9,79 % a un 14,93 % de ácido pentadecanoico, de un 0,13 % a un  
 50 0,27 % de ácido pentadecenoico, de un 32,80 % a un 26,90 % de ácido palmítico, de un 1,94 % a un 2,36 % de ácido palmitoleico, de un 1,89 % a un 2,69 % de ácido margárico, de un 1,28 % a un 1,59 % de ácido esteárico, de un 0,10 % a un 0,11 % de ácido oleico, de un 1,64 % a un 3,68 % de ácido vaccénico, de un 0,22 % a un 0,23 % de ácido araquídico, de un 0,01 % a un 0,14 % de ácido eicosenoico, de un 0,20 % a un 0,79 % de ácido  
 55 eicosadienoico, de un 0,12 % a un 0,17 % de ácido homo-gamma-linolénico, de un 0,38 % a un 0,90 % de ácido araquidónico, de un 0,08 % a un 0,03 % de ácido eicosatrienoico, de un 0,38 % a un 0,36 % de ácido eicosatetraenoico, de un 1,16 % a un 2,95 % de ácido eicosapentaenoico, queda un 0,00 % de ácido behénico, de un 0,43 % a un 0,39 % de ácido heneicosapentaenoico, de un 0,09 % a un 0,06 % de ácido docosadienoico, de un 0,19 % a un 0,46 % de ácido adrénico, de un 9,43 % a un 5,95 % de n-6 ácido docosapentaenoico, de un 0,27 % a un  
 60 un 0,54 % de n-3 ácido docosapentaenoico, de un 0,07 % a un 0,03 % de ácido lignocérico, de un 28,48 % a un 23,03 % de ácido docosahexaenoico, de un 0,03 % a un 0,18 % de ácido nervónico, y queda un 0,00 % de ácido hexacosanoico.

**[0139]** Lípido como porcentaje de ácido graso total: la presencia del antagonista de producción de ácido graso, norflurazón, puede cambiar la composición del ácido graso por ejemplo, de un 12,36 % a un 11,08 % de ácido

mirístico, queda un 0,12 % de ácido miristoleico, de un 2,71 % a un 3,16 % de ácido pentadecanoico, de un 0,35 % a un 0,33 % de ácido pentadecenoico, de un 43,24 % a un 40,61 % de ácido palmítico, de un 15,54 % a un 10,65 % de ácido palmitoleico, de un 0,80 % a un 1,03 % de ácido margárico, de un 1,61 % a un 1,52 % de ácido esteárico, de un 0,04 % a un 0,00 % de ácido oleico, de un 3,22 % a un 3,53 % de ácido vaccénico, de un 0,23 % a un 0,16 % de ácido araquídico, de un 0,00 % a un 0,02 % de ácido eicosenoico, de un 0,15 % a un 0,13 % de ácido eicosadienoico, de un 0,11 % a un 0,18 % de ácido homo-gamma-linolénico, de un 0,14 % a un 0,19 % de ácido araquidónico, queda un 0,00 % de ácido eicosatrienoico, de un 0,13 % a un 0,24 % de ácido eicosatetraenoico, de un 0,52 % a un 0,76 % de ácido eicosapentaenoico, de un 0,07 % a un 0,05 % de ácido behénico, queda un 0,00 % de ácido heneicosapentaenoico, de un 0,11 % a un 0,03 % de ácido docosadienoico, de un 0,23 % a un 0,17 % de ácido adrénico, de un 3,98 % a un 5,23 % de n-6 ácido docosapentaenoico, de un 0,13 % a un 0,19 % de n-3 ácido docosapentaenoico, de un 0,09 % a un 0,00 % de ácido lignocérico, de un 14,13 % a un 20,61 % de ácido docosahexaenoico, queda un 0,00 % de ácido nervónico, y queda un 0,00 % de ácido hexacosanoico.

## (2) Otras moléculas

15 **[0140]** Los microbios que producen aceite desvelados pueden producir adicionalmente carotenoides y xantófilas. Algunos ejemplos de tales carotenoides y xantófilas incluyen beta-caroteno, licopeno, astaxantina, cantaxantina, foenicoxantina, zeaxantina, equinenona, beta-criptoxantina, capsantina, lutina, annatto, beta-apo-8-carotenal y éster de beta-apo-8-carotenal.

20 **[0141]** Las xantófilas producidas por los microbios que producen los aceites desvelados se pueden conjugar con los diversos PUFA también producidos por los microbios que producen los aceites desvelados.

### (a) Antioxidantes

25 **[0142]** Por lo general, los antioxidantes son compuestos que reaccionan con, y por lo general son consumidos por el oxígeno. Dado que algunos antioxidantes por lo general reaccionan con el oxígeno, algunos antioxidantes también reaccionan por lo general con los generadores de radicales libres, y los radicales libres. ("The Antioxidants - The Nutrients that Guard Your Body" de Richard A. Passagua, Ph. D., 1985, Keats Publishing Inc.). Las composiciones  
30 pueden contener cualquier antioxidante, y una lista no limitante incluiría, pero no se limitaría a, antioxidantes no flavonoides y nutrientes que pueden atrapar directamente radicales libres incluyendo multi-carotenos, beta-carotenos, alfa-carotenos, gamma-carotenos, licopeno, luteína y zeaxantinas, selenio, Vitamina E, incluyendo alfa-, beta- y gamma-tocoferol, en particular alfa-tocoferol, etc., succinato de vitamina E, y Trolox (un análogo soluble de la Vitamina E), Vitamina C (ácido ascórbico) y Niacina (Vitamina B<sub>3</sub>, ácido nicotínico y nicotinamida), Vitamina A,  
35 ácido 13-cis retinoico, N-acetil-L-cisteína (NAC), ascorbato sódico, pirrolidin-editio-carbamato, y coenzima Q<sub>10</sub>; enzimas que catalizan la destrucción de los radicales libres incluyendo peroxidases tales como glutatión peroxidasa (GSHPX) que actúa sobre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y tales como peróxidos orgánicos, que incluyen catalasa (CAT) que actúa sobre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, superóxido dismutasa (SOD) que desproporciona a O<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, glutatión transferasa (GSHTx), glutatión reductasa (GR), glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), y miméticos, análogos y polímeros de los mismos  
40 (análogos y polímeros de enzimas antioxidantes, tales como SOD, se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos con n.º de Ser. 5.171.680); glutatión; ceruloplasmina; cisteína, y cisteamina (beta-mercaptoetilamina) y flavonoides y moléculas similares a los flavonoides tales como ácido fólico y folato. Una revisión de enzimas antioxidantes y miméticos de las mismas y nutrientes antioxidantes se puede encontrar en Kumar *et al.*, *Pharmac. Ther.* 39: 301, 1988 y Machlin L. J. y Bendich, *FASEB Journal* 1: 441-445, 1987.

45 **[0143]** Los flavonoides, también conocidos como "fenilcromonas", son compuestos solubles en agua, de origen natural que tienen características antioxidantes. Los flavonoides se distribuyen ampliamente en plantas vasculares y se encuentra en numerosos vegetales, frutas y bebidas tales como té y vino. Los flavonoides se conjugan con compuestos aromáticos. Los flavonoides que se producen más ampliamente son las flavonas y los flavonoles (por  
50 ejemplo, miricetina, (3,5,7,3',4',5',-hexahidroxiflavona), quercetina (3,5,7,3',4'-pentahidroxiflavona), kaempferol (3,5,7,4'-tetrahidroxiflavona), y las flavonas apigenina (5,7,4'-trihidroxiflavona) y luteolina (5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona) y glicósidos de los mismos y quercetina).

**[0144]** Los carotenoides son pigmentos naturales importantes producidos por muchos microorganismos y plantas,  
55 normalmente de color rojo, naranja o amarillo. Tradicionalmente, los carotenoides se han usado en las industrias alimentarias, de alimentación y nutraceuticas. Se sabe que son esenciales para el crecimiento y la fotosíntesis de las plantas, y que son una fuente dietética principal de vitamina A en seres humanos. Algunos antioxidantes dietéticos, tales como los carotenoides (beta-caroteno, licopeno, astaxantina, cantaxantina, zeaxantina, capsantina, luteína, annatto, beta-apo-8-carotenal éster de beta-apo-8-carotenal), presentan actividades anticáncer significativas y  
60 desempeñan un papel importante en la prevención de enfermedades crónicas. Los carotenoides son antioxidantes biológicos potentes que pueden absorber la energía excitada del oxígeno singlete en la cadena de carotenoide, conduciendo a la degradación de la molécula de carotenoide, pero evitando que se produzcan daños en otras moléculas o tejidos.

65 **[0145]** El oxígeno es necesario para las funciones metabólicas, pero también presenta desafíos para las células. El

organismo humano tiene una amplia gama de enzimas metabólicas y antioxidantes para que sus células se deshagan de moléculas derivadas de oxígeno. Se supone que este estrés oxidativo es un factor contribuyente factor en afecciones tales como artritis reumatoide, insuficiencia cardiaca isquémica y apoplejía, demencia de Alzheimer, cáncer y envejecimiento. Por lo tanto, los antioxidantes tienen el potencial de proteger frente a una amplia gama de enfermedades. Varios compuestos antioxidantes se han aislado a partir de fuentes microbianas marinas; estas incluyen astaxantina, beta-caroteno y otros carotenoides.

**[0146]** Los carotenoides son un grupo ampliamente distribuido de pigmentos de origen natural, con más de 700 pigmentos naturales solubles en lípido producidos principalmente por microalgas, macroalgas, especies bacterianas fúngicas, con astaxantina y sus derivados siendo de interés comercial en particular. La astaxantina es un protector antioxidante extremadamente eficaz. Además, a diferencia del beta-caroteno, la astaxantina usa rápidamente la barrera hematoencefálica/retiniana, y por lo tanto tiene también potencial para proteger enfermedades del cerebro y de los ojos. Algunos estudios preclínicos sugieren diversos efectos beneficiosos por el consumo de astaxantina tales como: (i) inhibir la formación y crecimiento de cáncer en la vejiga, colon, hígado, mama y la calidad oral; (ii) proteger la retina del ojo del daño oxidativo y por lo tanto tiene un efecto frente a la enfermedad macular relacionada con la edad; (iii) estimular el aumento de la actividad inmune, (iv) proporcionar protección del daño por la luz ultravioleta, así como (v) proporción al aumento del rendimiento muscular.

#### **b) Aislamiento de microorganismos**

**[0147]** Se desvelan microbios que producen aceite de la familia Thraustochytriaceae obtenidos con un método que comprende cebar una muestra vegetativa en agua salada (natural o artificial) con granos de polen e incubar; separar y transferir los granos a un medio heterótrofo e incubar; identificar un aislado que produce ácidos grasos, aislando lo del microorganismo aislado identificado de la familia Thraustochytriaceae. Algunas formas de aislamiento adicionales incluyen medio complementado con antibióticos apropiados e identificación a través de cualquier medio microscópico como se ha mencionado anteriormente o a través del uso de cebadores o sondas de gen de ARNr de 18S. El medio heterótrofo puede ser como se describe a continuación.

#### **5. Lípidos y otras moléculas producidas por el microorganismo eucariota**

**[0148]** Se desvelan composiciones lipídicas que comprenden de aproximadamente un 25 % en peso a aproximadamente un 40 % en peso de DHA n-3, de aproximadamente un 6 % en peso a aproximadamente un 10 % en peso de DPA n-6, y de aproximadamente un 0 % en peso a aproximadamente un 10 % en peso de EPA n-3.

**[0149]** La composición lipídica puede comprender adicionalmente de aproximadamente un 11 % en peso a aproximadamente un 15 % en peso (por ejemplo, aproximadamente un 13 % en peso) de ácido mirístico, de aproximadamente un 7 % en peso a aproximadamente un 11 % en peso (por ejemplo, aproximadamente un 9 % en peso) de ácido pentadecanoico, de aproximadamente un 37 % en peso a aproximadamente un 41 % en peso (por ejemplo, aproximadamente un 39 % en peso) de ácido palmítico, de aproximadamente un 3 % en peso a aproximadamente un 7 % en peso (por ejemplo, aproximadamente un 5 % en peso) de ácido palmitoleico, de aproximadamente un 0 % a aproximadamente un 3 % en peso (por ejemplo, aproximadamente un 1 % en peso) de ácido esteárico, o de aproximadamente un 1 % en peso a aproximadamente un 4 % en peso (por ejemplo, aproximadamente un 2 % en peso) de ácido oleico.

**[0150]** La composición lipídica puede comprender DHA n-3 en concentraciones en exceso de aproximadamente 400 mg de biomasa, DPA n-6 en concentraciones en exceso de 100 mg de biomasa.

**[0151]** La composición lipídica puede comprender adicionalmente carotenoides. Algunos ejemplos de tales carotenoides incluyen beta-caroteno, licopeno, astaxantina, zeaxantina, cantaxantina, equinenona, foenicoxantina, capsantina, luteína, annatto, beta-apo-8-carotenal, y éster de beta-apo-8-carotenal.

**[0152]** En un aspecto, la composición puede comprender al menos aproximadamente un 24 % en peso de DHA n-3, aproximadamente un 1 % en peso n-3 de DPA, aproximadamente un 6 % en peso de DPA n-6, y aproximadamente un 1 % en peso de EPA n-3.

#### **7. Composiciones que contienen las moléculas producidas por el microorganismo eucariota**

**[0153]** Un producto alimenticio, suplemento, composición farmacéutica tanto para ser humano como para animal (incluyendo marino) puede comprender la composición (lípido, lípido con antioxidante y antioxidante solo).

**[0154]** También se desvela una fórmula infantil que comprende la composición (lípido, lípido con antioxidante y antioxidante solo).

#### **C. Métodos**

## 1. Métodos para preparar lípidos

**[0155]** Se desvelan métodos para preparar una composición lipídica, métodos que comprenden: cultivar un microbio productor de aceite que comprende uno o más microorganismos de la familia Thraustochytriaceae, y aislar la  
5 composición lipídica.

**[0156]** También se desvelan métodos para preparar una composición lipídica, métodos que comprenden: cultivar un microbio productor de aceite en un medio heterótrofo que comprende un antagonista de producción de ácido graso.

**[0157]** También se desvelan métodos para preparar una composición lipídica, métodos que comprenden: cultivar un  
10 microbio productor de aceite en un medio heterótrofo que comprende un antagonista de producción de ácido graso, que comprende adicionalmente el aislamiento de la composición lipídica.

**[0158]** También se desvelan métodos para preparar una composición lipídica, métodos que comprenden: cultivar un microbio productor de aceite en un medio heterótrofo que comprende un antagonista de producción de ácido graso,  
15 en los que la proporción de ácidos grasos omega-3 y omega-6 con respecto a ácidos grasos omega-9 aumenta.

**[0159]** También se desvelan métodos para preparar una composición lipídica, métodos que comprenden: cultivar un microbio productor de aceite en un medio heterótrofo que comprende un antagonista de producción de ácido graso,  
20 en los que la proporción de ácidos grasos omega-3 y omega-6 con respecto a ácidos grasos omega-9 se altera en comparación con un control como se muestra en la Figura 11.

**[0160]** También se desvelan métodos para preparar una composición lipídica, métodos que comprenden: cultivar un microbio productor de aceite en un medio heterótrofo que comprende un antagonista de producción de ácido graso,  
25 en los que la proporción de ácidos grasos omega-3 y omega-6 con respecto a ácidos grasos omega-9 aumenta, en los que el contenido total de ácido graso no se altera.

**[0161]** También se desvelan métodos con los que el perfil de ácido graso de dicho organismo se pueden modificar para aumentar por ejemplo la concentración de EPA a través del suplemento del medio de fermentación o tales composiciones químicas usadas en la fermentación y producción de ácidos omega-3 y omega-6, con suplementos  
30 nutricionales, estímulos químicos e inhibidores que incluyen directamente en la ruta metabólica de ONC-T18. Se describe que estas enzimas tienen de forma específica actividades de elongasa, desaturasa o ácido graso sintasa. Hasta la fecha, el conocimiento de los inventores es que este es el primer caso de compuestos químicos que se han identificado específicamente que cuando se combinan (ya sea a través de fermentación o en puntos temporales específicos) con el medio de fermentación, modifican el perfil del ácido graso. Algunos ejemplos de compuestos de  
35 este tipo incluyen compuestos intermedios de ácido graso presentes dentro de la ruta de biosíntesis de lípido de estos microorganismos en particular, tales como ácido oleico (véase la Figura 14), que cuando se añaden al medio de fermentación dan como resultado un aumento del contenido de EPA dentro de las células.

**[0162]** Al contrario que los datos experimentales de Metz *et al.* (2001), en los que se documentó la incorporación de  
40 ácido oleico en una *Schizochytrium* sp., no se encontró que se produjera conversión de este producto en ácido graso poliinsaturado. En este caso, a través del uso de ácido oleico etiquetado con <sup>13</sup>C, el carbono <sup>13</sup>C que se origina en el ácido oleico enriquecido se encontró en ácidos grasos poliinsaturados posteriores y constituía el resto de la concentración de EPA elevada. Esto demuestra que la incorporación de ácidos grasos intermedios en el medio de cultivo no solamente da como resultado una incorporación satisfactoria en las células sino también una incorporación  
45 satisfactoria en el sistema de síntesis activa de desaturasa, elongasa y ácido graso sintasa.

**[0163]** Una diversidad de procedimientos se puede usar en la recuperación de la biomasa celular resultante a partir de fermentación en diversos medios de cultivo, tales como mediante filtración o centrifugación. A continuación, las células se pueden lavar, congelar, liofilizar, o secar por pulverización y almacenar en una atmósfera no oxidante para  
50 eliminar la presencia de oxígeno, antes de su incorporación en un alimento o producto alimenticio procesado.

**[0164]** Los lípidos celulares que contienen los PUFA (n-3) DHA, EPA y (n-6) DPA también se pueden extraer a partir de los biomasa celular tales como extracción con fluido supercrítico, o mediante extracción con disolventes tales como cloroformo, hexano, cloruro de metileno, o metanol, y el extracto resultante se evapora en condiciones de  
55 presión negativa para producir una muestra de material lipídico concentrado. Los PUFA omega-3 y omega-6 se pueden concentrar adicionalmente mediante hidrólisis de los lípidos y concentración de la fracción altamente insaturada usando métodos tradicionales tales como aducción de urea o destilación fraccionaria, cromatografía en columna, o mediante fraccionamiento con fluido supercrítico. A continuación, las células se pueden romper o lisar y los lípidos se pueden extraer en aceites vegetales o animales (por ejemplo, aceites de pescado). Los aceites  
60 extraídos se pueden refinar con procesos bien conocidos usados de forma rutinaria para refinar aceites vegetales (por ejemplo, mediante refinado químico o físico). Estos procesos de refinamiento eliminan impurezas de los aceites extraídos antes de su uso o de su venta, aceites comestibles. Después del refinado, los aceites se pueden usar directamente como aditivo alimentario o de alimento para producir productos enriquecidos en omega-3 y/o omega-6. Como alternativa, en aceite se puede procesar y purificar adicionalmente como se expone a continuación y se  
65 pueden usar a continuación en las aplicaciones mencionadas anteriormente y también en aplicaciones

farmacéuticas.

- [0165]** En otro proceso para la producción de aceites omega-3 u omega-6 enriquecidos (concentrados), la biomasa celular cosechada (fresca o seca) se puede romper o permeabilizar con técnicas bien conocidas tales como sonificación, métodos de intervención con cizallamiento y líquido, molienda con perlas, prensa a alta presión, congelación-descongelación, o digestión enzimática de la pared celular. Los lípidos de las células rotas se extraen mediante el uso de un disolvente o mezcla de disolventes tales como hexano, cloroformo, éter, o metanol. El disolvente se retira y los lípidos se hidrolizan con el uso de cualquier método bien conocido para convertir triglicéridos en ácidos grasos libres o ésteres de ácidos grasos incluyendo hidrólisis con base, ácido o enzimática.
- 5 Después de completarla hidrólisis, los compuestos no saponificables se extraen en un disolvente tal como éter, hexano o cloroformo y se eliminan. La solución restante se acidifica a continuación mediante la adición de un ácido, y el ácido graso libre extraído en un disolvente tal como hexano, éter o cloroformo. La solución de disolvente que contiene los ácidos grasos se puede enfriar a continuación a una temperatura lo suficientemente baja a la cristalización de los compuestos que no son PUFA, que a continuación se pueden retirar por filtración, centrifugación
- 10
- 15 o sedimentación, dando como resultado la concentración de los compuestos PUFA restantes y se pueden usar como suplementos nutricionales para seres humanos, como un aditivo alimentario, o con aplicaciones farmacéuticas.

**[0166]** Además se desvela una composición lipídica preparada con los métodos desvelados anteriormente.

- 20 **[0167]** Los microorganismos de la familia Thraustochytriaceae pueden ser cualquiera de los microorganismos desvelados anteriormente.

#### a) Medio

- 25 **[0168]** El medio heterótrofo puede comprender sal marina (artificial o natural), una o más fuentes de carbono, y una o más fuentes de nitrógeno. La sal marina puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 2, 0 g l<sup>-1</sup> a aproximadamente 40,0 g l<sup>-1</sup>. La concentración de la fuente de carbono y nitrógeno usada en condiciones convencionales de cultivo (no para concentración elevada, sino más bien para fermentación rentable) entra dentro del intervalo de 5 g l<sup>-1</sup> a 60 g l<sup>-1</sup> y de 4 g l<sup>-1</sup> a 10 g l<sup>-1</sup>, respectivamente. Para fragmentación de concentración elevada,
- 30 la concentración de la fuente de carbono y nitrógeno usada en condiciones convencionales de cultivo entra dentro del intervalo de 100 g l<sup>-1</sup> a 160 g l<sup>-1</sup> y de 40 g l<sup>-1</sup> a 60 g l<sup>-1</sup>, respectivamente. Siendo la tendencia la acumulación de aceite, el microbio productor de aceite se cultivan en un medio de cultivo (como los que se han descrito anteriormente) en el que el suministro de nitrógeno se limita después de aproximadamente 24 a aproximadamente 48 horas, aunque el suministro de carbono sigue siendo abundante. Este microbio productor de aceite continúa
- 35 asimilando el carbono (en forma de azúcares sencillos) pero ya no puede sufrir más división celular debido a una falta de nitrógeno para la generación de proteínas y ácidos nucleicos relevantes. El resultado es que estos azúcares se convierten en aceites de almacenamiento, en gran parte de la misma manera que describe Ratledge C. (*Lipid Tech.* 16: 34-39, 2004) y la figura 1 representa este fenómeno para estos organismos.
- 40 **[0169]** la fuente de nitrógeno puede ser una o más de peptona, extracto de levadura, extracto de malta, y glutamato sódico. La fuente de nitrógeno también puede ser agua de macerado de maíz o extracto de semilla de algodón. La fuente de nitrógeno puede comprender extracto de levadura y/o peptona o glutamato monosódico. Por ejemplo, la fuente de nitrógeno puede incluir, pero no se limita a, EMD™ YE-MSG, EMD™ YE, EMD™ Peptona-MSG, Sigma™ YE-MSG, Sigma™ YE, Fermtech™ YE-MSG, Fermtech™ YE, o harina de pescado (62 % de proteína). El extracto
- 45 de levadura puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 2 g l<sup>-1</sup>. El glutamato monosódico puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 8 g l<sup>-1</sup>.

- [0170]** La fuente de carbono puede ser una o más de D-trehalosa, glicerol, ácido D-glucónico, ácido L-láctico, ácido D,L-málico, D-ribosa, Tween 20, D-fructosa, acetato, ácido acético, alfa-D-glucosa, maltosa, timidina, L-asparagina, D-xilosa, Tween 40, ácido α-ceto-glutárico, sacarosa, L-glutamina, Tween 80, beta-metil-D-glucósido, maltotriosa, adenosinina, ácido fumárico, ácido bromosuccínico, L-serina, D-celobiosa, L-alanil-glicina, piruvato de metilo, ácido L-málico, glicil-L-prolina, D-palcosa, L-lixosa, ácido pirúvico, alfa-D-lactosa, dextrina, D-arabinosa, 2-desoxi-D-ribosa, gelatina, dextrosa, almidón, 3-0-beta-D-galactopiranosil-D-arabinosa, D-tagatosa, ácido 5-ceto-D-glucónico, ácido oxalomálico, ácido sórbico, L-ornitina, y dihidroxi acetato. En un aspecto, la fuente de carbono puede ser ácido D,L-málico, D-fructosa, D-xilosa, ácido fumárico, D-celobiosa, ácido 5-ceto-D-glucónico, ácido pirúvico, alfa-D-lactosa, dextrina de maíz, gelatina, almidón de maíz o almidón de trigo. La fuente de carbono puede estar presente en una
- 50
- 55 cantidad de de aproximadamente 1 g l<sup>-1</sup> a aproximadamente 60 g l<sup>-1</sup> y hasta aproximadamente 200 g l<sup>-1</sup>.

- [0171]** En un ejemplo, el medio puede comprender aproximadamente 5 g de D-glucosa, aproximadamente 2 g de peptona, y aproximadamente 2 g de extracto de levadura por litro de agua salada (natural o artificial). En otro ejemplo, el medio puede comprender aproximadamente 60 g de D-glucosa, aproximadamente 10 g de extracto de levadura por litro de agua salada (natural o artificial). En otro ejemplo, con el medio puede comprender aproximadamente 8 g de extracto de levadura, 32 g de MSG, 24 g de sal marina (natural y artificial) y 300 g de D-glucosa por litro.
- 60
- 65

[0172] El medio puede comprender adicionalmente fosfatos (por ejemplo, fosfato potásico y fosfatos de sodio). El medio puede comprender adicionalmente sales inorgánicas (por ejemplo, sulfato de amonio, bicarbonato sódico, ortovanadiato sódico, cromato potásico, molibdato sódico, ácido selenioso, sulfato de níquel, sulfato de cobre, sulfato de cinc, cloruro de cobalto, cloruro de hierro, cloruro de manganeso). El medio puede comprender adicionalmente compuesto de quelación (por ejemplo, EDTA). El medio puede comprender adicionalmente vitaminas (por ejemplo, clorhidrato de piridoxina, clorhidrato de tiamina, pantotenato cálcico, ácido p-aminobenzoico, riboflavina, ácido nicotínico, biotina, ácido fólico, y vitamina B<sub>12</sub>). El medio puede estar a un pH de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 6,5.

[0173] La incubación puede ser de aproximadamente 1 a aproximadamente 9 días (por ejemplo, de aproximadamente 3 a aproximadamente 5 días). La incubación puede ser de aproximadamente 18 a aproximadamente 30 °C (por ejemplo, de aproximadamente 18-25 °C). La Figura 8 muestra la diferencia en la producción de biomasa, contenido de TFA DHA de las células y tasa de absorción de glucosa cuando la cepa ONC-T18 se cultiva en fermentador en un régimen semicontinuo durante 88 horas tanto a 18 °C como a 25 °C. En este caso, la proporción de la producción de glucosa (o metabolismo de carbono) con respecto a TFA varía de 8,1 a 3,0. Esto significa que a 18 °C, son necesarios 8,1 g de glucosa para generar 1 g de TFA, mientras ya 25 °C solamente se necesitan 3,0 g de glucosa. La incubación puede comprender adicionalmente agitación o aireación.

[0174] El aislamiento del líquido puede comprender poner en contacto los microorganismos con un disolvente de extracción. El disolvente de comprender una o más disolventes elegidos entre cloroformo, hexano, metanol, o etanol, o CO<sub>2</sub> supercrítico.

[0175] El método puede producir cualquiera de las composiciones como se ha desvelado anteriormente.

[0176] El microbio productor de aceite puede producir una composición lipídica que comprende DHA n-3 en una cantidad superior o igual a aproximadamente 20 g l<sup>-1</sup> de medio. El microbio productor de aceite puede producir una composición lipídica que comprende DHA n-3 en una cantidad superior o igual a aproximadamente 40 g l<sup>-1</sup> de medio. El microbio productor de aceite puede producir una composición lipídica que comprende DHA n-3 en una cantidad superior o igual a aproximadamente 80 g l<sup>-1</sup> de medio.

## 30 2. Identificación sistemática y métodos de identificación

[0177] El microbio productor de aceite como se desvela en el presente documento puede producir un lípido que contiene la serie (n-3) de ácido docosahexaenoico y de ácido eicosapentenoico y la serie (n-6) de DPA. Estos microbios que producen aceite se pueden seleccionar, por ejemplo, con el siguiente método de identificación sistemática. Las muestras vegetativas se pueden colocar (y se colocaron) en viales de 20 ml que contenían 10 ml de agua marina natural estéril filtrada con filtro de 0,2 µm que contenía penicilina y estreptomina a 300 y 500 mg l<sup>-1</sup>, respectivamente. A continuación, los viales se cebaron con granos de polen estéril y se incubaron durante 48 horas de 18 a 25 °C. Los granos de polen se transfirieron a continuación en placas de agar que contenían antibióticos (como anteriormente) y se incubaron en las mismas condiciones. Las colonias hialinas, irregulares, individuales formadas por células esféricas o limaciiformes y atípicas de cualquier colonia de levadura o bacterias se seleccionaron y se subcultivaron en el mismo medio y en las mismas condiciones que anteriormente. A continuación, estos aislados se identifican sistemáticamente para crecimiento y ácidos grasos usando un medio líquido de nutrientes, preparado con agua marina natural filtrada con filtro de 0,2 µm que contenía 5 g l<sup>-1</sup> de glucosa, 2 g l<sup>-1</sup> de peptona y 2 g l<sup>-1</sup> de extracto de levadura, con la biomasa celular resultante recogida mediante centrifugación o sedimentación con un medio líquido. Los ácidos grasos se transesterificaron directamente usando métodos convencionales, con la composición de éster de metilo del ácido graso analizada a través de cromatografía de gases, con cepas que producen cantidades apropiadas de la serie n-3 de DHA y de la serie n-6 de DPA seleccionadas para trabajo adicional.

[0178] Se desvelan métodos para identificar un microbio productor de aceite, métodos que comprenden: cebar una muestra vegetativa en agua salada (agua de mar natural o artificial) con granos de polen e incubar; transferir los granos a un medio heterótrofo e incubar; e identificar aislados que producen ácidos grasos.

[0179] También se desvelan composiciones lipídicas producidas por los microbios que producen los aceites identificados anteriormente.

[0180] También se desvelan composiciones lipídicas producidas por métodos usando los microbios que producen los aceites desvelados y los métodos desvelados en el presente documento.

[0181] También se desvelan microbios que producen aceite que tienen el número de registro PTA-6245 de la Colección Americana de Cultivos Tipo.

[0182] También se desvelan microbios que producen aceite que pertenecen al orden *Thraustochytriales* (ONC-T18) que tienen la secuencia de ARNr de 18S, tal como la SEQ ID 1, y se identifican como *Thraustochytrium* sp.

[0183] También se desvelan microbios que producen aceite que pertenecen al orden *Thraustochytriales* (ONC-T18) que tienen la secuencia de ARNr de 18S, tal como el número de registro DQ374149 en GenBank, y se identifican como *Thraustochytrium* sp.

5 [0184] También se desvela un microbio productor de aceite, *Thraustochytrium* sp. capaz de producir DHA y DPA en concentraciones en exceso de 400 mg l<sup>-1</sup> y 100 mg l<sup>-1</sup>, respectivamente.

[0185] También se desvela es un microbio productor de aceite, *Thraustochytrium* sp. capaz de producir carotenoides a través de fermentación heterótrofa como se ha mencionado anteriormente en el intervalo de 50 a 1250 mg kg<sup>-1</sup> y  
10 astaxantina, zeaxantina, cantaxantina, equinenina y beta-caroteno en el intervalo de 1 a 20 mg kg<sup>-1</sup>, de 0,25 a 10 mg kg<sup>-1</sup>, de 1 a 20 mg kg<sup>-1</sup>, de 1 a 20 mg kg<sup>-1</sup> y de 1 a 200 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente.

[0186] También se desvelan procesos para cultivar un microbio productor de aceite que comprende, cultivar el microbio productor de aceite en condiciones, en los que las condiciones comprenden un medio que comprende  
15 cloruro sódico en forma de sal marina artificial (marina trófica) entre 2,0 y 15,0 g l<sup>-1</sup>; una fuente de nitrógeno en forma de extracto de levadura y glutamato monosódico a 2,0 y 8,0 g l<sup>-1</sup> respectivamente; y carbono en forma de glucosa hasta 130 g l<sup>-1</sup>. También se desvelan procesos para cultivar un microbio productor de aceite que comprende, cultivar el microbio productor de aceite en condiciones, en los que las condiciones comprenden un medio que comprende  
20 de extracto de levadura y glutamato monosódico a 2,0 y 8,0 g l<sup>-1</sup> respectivamente; y carbono en forma de glucosa hasta 130 g l<sup>-1</sup> que comprende adicionalmente uno o más antagonistas de producción de ácido graso.

[0187] Los procesos desvelados pueden cultivar, por ejemplo, la cepa ONC-T18, con lo que al menos un 24 % en peso es DHA, al menos un 6 % en peso es DPA y al menos un 1 % es EPA de ácido graso total.

25 [0188] Los procesos desvelados para cultivó también pueden, por ejemplo, cultivar la cepa ONC-T18 de modo que al menos un 1 % en peso es material carotenoides, siendo astaxantina de un 1 a un 2 % y al menos un 1,2 % del mismo, siendo zeaxantina de un 0,25 a un 1 % y al menos un 0,45 %, siendo cantaxantina de un 5 a un 16 % y al menos un 9 %, siendo equinenona de un 1 a un 2 % al menos un 1,2 % del mismo y siendo beta-caroteno de un 12  
30 a un 16 % y al menos un 14 % en peso.

### 3. Ácidos nucleicos

[0189] Existe una diversidad de moléculas desveladas en el presente documento que se basan en ácido nucleico, que incluyen, por ejemplo, los ácidos nucleicos que codifican, por ejemplo, ARNr, así como cualquier otra proteína desvelada en el presente documento, así como diversos ácidos nucleicos funcionales. Los ácidos nucleicos desvelados están formados, por ejemplo, por nucleótidos, análogos de nucleótidos, o sustitutos de nucleótidos. Algunos ejemplos no limitantes de estas y otras moléculas se discuten en el presente documento. Se entiende que, por ejemplo, cuando un vector se expresa en una célula, el ARNm expresado por lo general estará formado por A, C,  
40 G, y U/T. De forma análoga, se entiende que si, por ejemplo, una molécula antisentido se introduce en una célula o entorno celular a través de, por ejemplo, administración exógena, es ventajoso que la molécula antisentido esté formada por análogos de nucleótido que reducen la degradación de la molécula anti sentido en el entorno celular.

#### a) Nucleótidos y moléculas relacionadas

45 [0190] Un nucleótido es una molécula que contiene un resto de base, un resto de azúcar y un resto de fosfato. Los nucleótidos se pueden unir entre sí a través de sus restos de fosfato y restos de azúcar creando un enlace internucleósido. El resto de base de un nucleótido puede ser adenin-9-ilo (A), citosin-1-ilo (C), guanin-9-ilo (G), uracil-1-ilo (U), y timin-1-ilo (T). El resto de azúcar de un nucleótido es una ribosa o una desoxirribosa. El resto de  
50 fosfato de un nucleótido es fosfato pentavalente. Un ejemplo no limitante de un nucleótido sería 3'-AMP (monofosfato de 3'-adenosina) o 5'-GMP (monofosfato de 5'-guanosina).

[0191] Un análogo de nucleótido es un nucleótido que contiene algún tipo de modificación en forma de restos de base, azúcar, o fosfato. En la técnica se conocen bien algunas modificaciones de nucleótidos e incluirían por  
55 ejemplo, 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, y 2-aminoadenina, así como modificaciones en los restos de azúcar o fosfato.

[0192] Los sustitutos de nucleótidos son moléculas que tienen propiedades funcionales similares a las de los nucleótidos, pero que no contienen un resto de fosfato, tal como ácido nucleico peptídico (PNA). Los sustitutos de  
60 nucleótidos son moléculas que reconocerán los ácidos nucleicos de una manera de Watson-Crick o Hoogsteen, pero que están unidos entre sí a través de un resto distinto de un resto de fosfato. Los sustitutos de nucleótidos son capaces de ajustarse a una estructura de tipo doble hélice cuando interactúan con el ácido nucleico diana apropiado.

[0193] También es posible unir otros tipos de moléculas (conjugados) a nucleótidos o análogos de nucleótidos para  
65 mejorar, por ejemplo, la captación celular. Los conjugados se pueden unir por vía química a los nucleótidos o

análogos de nucleótidos. Tales conjugados incluyen, pero no se limitan a, restos lipídicos tales como un resto colesterol. (Letsinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 6553-6556, 1989).

5 **[0194]** Una interacción de Watson-Crick es al menos una interacción con la cara de Watson-Crick de un nucleótido, análogo de nucleótido, o sustituto de nucleótido. La cara de Watson-Crick de un nucleótido, análogo de nucleótido, o sustituto de nucleótido incluye las posiciones C2, N1, y C6 de un nucleótido, análogo de nucleótido, o sustituto de nucleótidos basados en purina y las posiciones C2, N3, C4 de un nucleótido, análogo de nucleótido, sustituto o nucleótidos basados en pirimidina.

10 **[0195]** Una interacción de Hoogsteen es la interacción que se produce en la cara Hoogsteen de un nucleótido o análogo de nucleótido, que se expone en el surco principal del ADN de doble hélice. La cara de Hoogsteen incluye la posición N7 y grupos reactivos (NH<sub>2</sub> u O) en la posición C6 de nucleótidos de purina.

#### b) Secuencias

15 **[0196]** Hay una diversidad de secuencias relacionadas con, por ejemplo, la SEQ ID NO: 1, así como cualquier otro ácido nucleico y proteína desvelados en el presente documento que se pueden desvelar en GenBank.

20 **[0197]** En el presente documento se proporciona una diversidad de secuencias y estas y otras se pueden encontrar en GenBank, en [www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov). Los expertos en la materia entienden cómo resolver las discrepancias y diferencias de las secuencias y cómo ajustar las composiciones y métodos relacionados con una secuencia en particular con otras secuencias relacionadas. Los cebadores y/o sondas se pueden diseñar para cualquier secuencia dada la información desvelada en el presente documento y conocida en la técnica.

#### c) Cebadores y sondas

25 **[0198]** Se desvelan composiciones que incluyen cebadores y sondas, que son capaces de interactuar con los genes que se desvelan en el presente documento. En ciertas realizaciones, los cebadores se usan para apoyar las reacciones de amplificación de ADN. Por lo general, los cebadores serán capaces de extenderse de una manera específica de secuencia. La extensión de un cebador de una manera específica de secuencia incluye cualquier  
30 método en el que la secuencia y/o la composición de la molécula de ácido nucleico a la que se hibrida el cebador se hibrida o de otra manera se asocia dirige o influye en la composición o secuencia del producto producido por la extensión del cebador. Por lo tanto, la extensión del cebador de una manera específica de secuencia incluye, pero no se limita a, PCR, secuenciación de ADN, extensión del ADN, polimerización de ADN, transcripción de ARN, o transcripción inversa. Son preferentes las técnicas y condiciones que amplifican el cebador de una manera  
35 específica de secuencia. En ciertos aspectos, los cebadores se pueden usar como sondas específicas de especies o género para el *Thraustochytrium* mencionado en el presente documento. En este caso, los cebadores se diseñarían para que fueran específicos para el microorganismo eucariota, con las reacciones de PCR realizadas posteriormente. La presencia de especies diana se determinarían a continuación mediante formación satisfactoria de producto de PCR. En ciertos aspectos, los cebadores también se pueden usada para reacciones de amplificación de  
40 ADN, tal como PCR o secuenciación directa. Se entiende que en ciertos aspectos los cebadores también se pueden extender usando técnicas no enzimáticas, en las que, por ejemplo, los nucleótidos u oligonucleótidos usados para extender el cebador se modifican de de un modo tal que reaccionarán químicamente para extender el cebador de una manera específica de secuencia. Por lo general, los cebadores desvelados se hibridan con el ácido nucleico o región del ácido nucleico o se hibridan con el complemento del ácido nucleico o complemento de una región del  
45 ácido nucleico.

#### d) Suministro de Ácido Nucleico

50 **[0199]** En los métodos descritos anteriormente que incluyen la administración y captación de ADN exógeno en las células de un sujeto (es decir, transducción o transfección genética), los ácidos nucleicos desvelados pueden estar en forma de ADN o ARN desnudo, o los ácidos nucleicos pueden estar en un vector para suministro de los ácidos nucleicos a las células, con lo que el fragmento de ADN que codifica el anticuerpo está bajo la regulación transcripcional de un promotor, como entendería bien un experto habitual en la materia. El vector puede ser una preparación disponible en el mercado, tal como un vector de adenovirus (Quantum Biotechnologies, Inc. (Laval,  
55 Quebec, Canadá). El suministro del ácido nucleico o vector a las células se puede realizar a través de una diversidad de mecanismos. Como uno ejemplo, el suministro se puede realizar a través de un liposoma, usando preparaciones de liposomas disponibles en el mercado tales como LIPOFECTIN, LIPOFECTAMINE (GIBCO-BRL, Inc., Gaithersburg, MD), SUPERFECT (Qiagen, Inc. Hilden, Alemania) y TRANSFECTAM (Promega Biotec, Inc., Madison, WI), así como otros liposomas desarrollados de acuerdo con procedimientos convencionales en la técnica.  
60 Además, el ácido nucleico o vector desvelados se puede enviar *in vivo* mediante electroporación, la tecnología para la que está disponible en Genetronics, Inc. (San Diego , CA), así como por medio de una máquina de SONOPORACIÓN (ImaRx Pharmaceutical Corp., Tucson, AZ).

**[0200]** Como un ejemplo, el suministro del vector se puede realizar a través de un sistema viral, tal como un sistema de vector retroviral que puede empaquetar un genoma retroviral recombinante (véase por ejemplo, Pastan *et al.*,

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 4486, 1988; Miller *et al.*, Mol. Cell. Biol. 6: 2895, 1986). El retrovirus recombinante se puede usar a continuación para infectar y de este modo suministrar al ácido nucleico de las células infectadas que codifica un anticuerpo ampliamente neutralizante (o un fragmento activo del mismo). El método exacto para introducir el ácido nucleico alterado en células de mamífero no se limita, por supuesto al uso de vectores retrovirales.

- 5 Otras técnicas están ampliamente disponibles para este procedimiento incluyendo el uso de vectores adenovirales (Mitani *et al.*, Hum. Gene Ther. 5: 941-948, 1994), vectores virales adeno-asociados (AAV) (Goodman *et al.*, Blood 84: 1492-1500, 1994), vectores lentivirales (Naidini *et al.*, Science 272: 263-267, 1996), vectores retrovirales pseudotipados (Agrawal *et al.*, Exper. Hematol. 24: 738-747, 1996). También se pueden usar algunas técnicas de transducción físicas, tales como administración de liposomas y mecanismos mediados por receptor y otros  
10 mecanismos de endocitosis (véase, por ejemplo, Schwartzenberger *et al.*, Blood 87: 472-478, 1996). Estas composiciones y métodos desvelados se pueden usar en conjunto con cualquiera de estos métodos de transferencia genética u otros usados normalmente.

#### 4. Sistemas de expresión

15

**[0201]** Los ácidos nucleicos que se suministran a las células por lo general contienen sistemas que controlan la expresión. Por ejemplo, los genes insertados en sistemas virales y retrovirales normalmente contienen promotores, y/o potenciadores para ayudar a controlar la expresión del producto genético deseado. Por lo general, un promotor es una secuencia o secuencias de ADN que funcionan cuando se encuentran en una ubicación relativamente fija con  
20 respecto al sitio de inicio de la transcripción. Un promotor contiene elementos básicos requeridos para la interacción básica de la ARN polimerasa y factores de transcripción, y puede contener elementos cadena arriba y elementos de respuesta.

- [0202]** Se entiende que hay una gran diversidad de sistemas de control de la transcripción que se pueden usar en  
25 los organismos que se desvelan en el presente documento, además de los sistemas generales que se discuten a continuación. Se entiende que los organismos que se desvelan en el presente documento se pueden transfectar y transformar con una diversidad de genes, tales como genes marcadores, como se discute en el presente documento, o genes que tienen otros atributos deseables, tales como características de crecimiento mejoradas o únicas.

30

##### a) Promotores y Potenciadores Virales

- [0203]** Los promotores preferentes que controlan la transcripción de vectores en células hospedadoras de mamífero se pueden obtener de diversas fuentes, por ejemplo, los genomas de virus tales como: polioma, Virus 40 de Simio  
35 (SV40), adenovirus, retrovirus, virus de la hepatitis B y lo más preferentemente citomegalovirus, o a partir de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo el promotor de beta actina. Los promotores temprano y tardío del virus SV40 se obtienen de forma conveniente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de la replicación viral de SV40 (Fiers *et al.*, Nature, 273: 113, 1978). El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene de forma conveniente como un fragmento de restricción *HindIII* E (Greenway, P.J. *et al.*, Gene 18: 355-360, 1982). Por supuesto, los promotores de la célula hospedadora o especies relacionadas también son útiles en el presente documento.

- [0204]** Por lo general, potenciador se refiere a una secuencia de ADN que funciona a una distancia no fijada desde el sitio de inicio de la transcripción y puede ser cualesquiera de las posiciones 5' (Laimins, L. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 78: 993, 1981) o 3' (Lusky, M.L., *et al.*, Mol. Cell Bio. 3: 1108, 1983) con respecto a la unidad de transcripción. Además, los potenciadores pueden estar dentro de un intrón (Banerji, J.L. *et al.*, Cell 33: 729, 1983) así como dentro de la propia secuencia de codificación (Osborne, T.F., *et al.*, Mol. Cell Bio. 4: 1293, 1984). Por lo general tienen una longitud entre 10 y 300 pb, y funcionan en configuración *cis*. Los potenciadores también funcionan para aumentar la transcripción desde los promotores cercanos. A menudo, los potenciadores también contienen elementos de  
50 respuesta que median la regulación de la transcripción. A menudo, los promotores también contienen elementos de respuesta que median la regulación de la transcripción. A menudo, los potenciadores determinan la regulación de la expresión de un gen. Aunque en la actualidad se conocen muchas secuencias de potenciadores a partir de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, alfa-fetoproteína e insulina), por lo general para la expresión general se usará un potenciador de un virus de célula eucariota. Algunos ejemplos preferentes son el  
55 potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (100-270 pb), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación, y potenciadores de adenovirus.

- [0205]** El promotor y/o potenciador se puede activar de forma específica ya sea por sucesos químicos ligeros o  
60 específicos que desencadenan su función. Los sistemas se pueden regular con reactivos tales como tetraciclina y dexametasona. También hay formas de mejorar la expresión genética del vector viral mediante exposición a radiación, tal como radiación gamma, o alquilación de fármacos para de quimioterapia.

- [0206]** En ciertas realizaciones, la región del promotor y/o potenciador puede actuar como un promotor y/o  
65 potenciador constitutivo para maximizar la expresión de la región de la unidad de transcripción a transcribir. En

determinadas construcciones de la región del promotor y/o potenciador puede ser activa en todos los tipos de células eucariotas, incluso si solamente se expresa en un tipo particular de célula en un momento en particular. Un promotor preferente de este tipo es el promotor de CMV (650 pb). Otros promotores preferentes son promotores de SV40, citomegalovirus (promotor de longitud completa), y vector retroviral LTF.

5

**[0207]** Se ha demostrado que todos los elementos reguladores específicos se pueden clonar y usar para construir vectores de expresión que se expresan de forma selectiva en tipos de células específicas tales como células de melanoma. El promotor de la proteína acética fibrilar glial (GFAP) se ha usado para expresar genes de forma selectiva en células de origen glial.

10

**[0208]** Los vectores de expresión usados en células hospedadoras eucariotas (células de levaduras, hongos, insectos, plantas, animales, humanas o nucleadas) también pueden contener secuencias necesarias para la terminación de la transcripción que pueden influir en la expresión del ARNm. Estas regiones se transcriben como segmentos poliadenilados en la porción no traducida de la proteína del factor tisular que codifica el ARNm. Las regiones sin traducir en la posición 3' también incluyen sitios de terminación de la transcripción. Es preferente que la unidad de transcripción también contenga una región de poliadenilación. Un beneficio de esta región es que aumenta la probabilidad de que la unidad transcrita se procese y se transporte como ARNm. La identificación y uso de señales de poliadenilación en construcciones de expresión están bien establecidos. Es preferente que las señales de poliadenilación homólogas se usen en las construcciones transgénicas. En ciertas unidades de transcripción, la región de poliadenilación se deriva de la señal temprana de poliadenilación de SV40 y consta de aproximadamente 400 bases. También es preferente que las unidades de transcritas contengan otras secuencias convencionales o las o en combinación con las secuencias anteriores para mejorar la expresión, o la estabilidad de, la construcción.

15

20

#### b) Marcadores

25

**[0209]** Los vectores virales pueden incluir secuencia de ácido nucleico que codifica un producto marcador. Este producto marcador se usa para determinar si el gen se ha suministrado a la célula y una vez suministrado si se está expresando. Algunos genes marcadores preferentes son el gen *lacZ* de *E. coli*, que codifica  $\beta$ -galactosidasa, y proteína fluorescente de color verde.

30

**[0210]** En algunas realizaciones el marcador puede ser un marcador seleccionable. Algunos ejemplos de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero son dihidrofolato reductasa (DHFR), timidina quinasa, neomicina, el análogo G418 de neomicina, hidromicina, y puromicina. Cuando tales marcadores seleccionables se transfieren de forma satisfactoria en una célula hospedadora de mamífero, la célula hospedadora de mamífero transformada puede sobrevivir si se coloca bajo presión selectiva. Hay dos categorías distintas de regímenes de selección usadas ampliamente. La primera categoría se basa en el metabolismo de la célula y el uso de una línea celular mutante que carece de la capacidad de crecer independiente de un medio suplementado. Dos ejemplos son: células CHO DHFR y células LTK de ratón. Estas células carecen de la capacidad de crecer sin la adición de nutrientes tales como timidina o hipoxantina. Dado que estas células carecen de ciertos genes necesarios para una ruta de síntesis de nucleótidos completa, no pueden sobrevivir a menos que se proporcionen los nucleótidos que faltan en un medio suplementado. Una alternativa al suplemento de los medios es introducir un gen de DHFR o TK intacto en células que carecen de los respectivos genes, alterando de este modo sus requisitos de crecimiento. Las células individuales que no se transformaron con el gen DHFR o TK no serán capaces de sobrevivir en medios no suplementados.

35

40

**[0211]** La segunda categoría es la selección dominante que se refiere a un esquema de selección usado en cualquier tipo celular y no requiere el uso de una línea celular mutante. Estos esquemas por lo general usan un fármaco para detener el crecimiento de una célula hospedadora. Esas células que tienen un gen nuevo expresarían una proteína que confiere resistencia al fármaco y sobrevivirían a la selección. Algunos ejemplos de una selección dominante de este tipo usan los fármacos neomicina, (Southern P. y Berg, P., J. Molec. Appl. Genet. 1: 327,1982), ácido micofenólico, (Mulligan, R.C. y Berg, P. Science 209: 1422, 1980) o higromicina, (Sugden, B. *et al.*, Mol. Cell. Biol. 5: 410-413, 1985). Los tres ejemplos usan genes bacterianos bajo control eucariota para conferir resistencia al fármaco G418 o neomicina (geneticina), xgpt (ácido micofenólico) o higromicina, apropiados, respectivamente. Otros incluyen el análogo de neomicina G418 y puramicina.

45

50

## 5. Péptidos

### a) Variantes de proteína

55

**[0212]** Como se discute en el presente documento hay numerosas variantes de las proteínas del organismo desvelado que se conocen y se contemplan en el presente documento. Además de la cepa de *Thraustochytriales* funcional conocida hay derivados de las proteínas de *Thraustochytriales* que también funcionan en los métodos y composiciones desvelados. Los expertos en la materia entienden bien las variantes y derivados de proteína y pueden implicar modificaciones de la secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, algunas modificaciones de la secuencia de aminoácidos por lo general entran en una o más de tres clases: variantes de sustitución, inserción o

60

65

- supresión. Algunas inserciones incluyen fusiones de amino y/o carboxilo terminal así como inserciones intrasecuencia de un solo aminoácido o múltiples restos de aminoácidos. Por lo general, las inserciones serán inserciones más pequeñas que las de las fusiones de amino o carboxilo terminal, por ejemplo, del orden de uno a cuatro restos. Algunos derivados de proteína de fusión inmunogénica, tales como los se describen en los ejemplos, se preparan por fusión de un polipéptido lo suficientemente grande como para conferir inmunogenicidad a la secuencia diana mediante reticulación *in vitro* o mediante cultivo celular recombinante transformado con ADN que codifican la fusión. Algunas supresiones se caracterizan por la retirada de uno o más restos de aminoácido de la secuencia de proteínas. Por lo general, no se suprimen más de aproximadamente 2 a 6 restos en cualquier sitio dentro de la molécula de proteína. Estas variantes normalmente se preparan mediante mutagénesis específica del sitio de nucleótidos en el ADN que codifica la proteína, produciendo de ese modo un ADN que codifican la variante, y a partir de ese momento expresión del ADN en cultivo celular recombinante. Algunas técnicas para preparar mutaciones de sustitución en sitios determinados previamente en el ADN que tienen una secuencia conocidas se conocen bien, por ejemplo mutagénesis del cebador M13 y mutagénesis de PCR. Por lo general, las sustituciones de aminoácidos son de un solo resto, pero se pueden producir en un número de posiciones diferentes de una vez; las inserciones normalmente serán del orden de aproximadamente 1 a 10 restos de aminoácidos; y las supresiones variarán de aproximadamente 1 a 30 restos. Las supresiones o las inserciones se realizan preferentemente en pares adyacentes, es decir, 1 supresión de 2 restos o inserción de 2 restos. Las sustituciones, supresiones, inserciones o cualquier combinación de las mismas se pueden combinar para llegar a una construcción final. Las mutaciones no se deben colocar en la secuencia fuera del marco de lectura and preferentemente no crearan regiones complementarias que podrían producir una estructura secundaria de ARNm. Las variantes de sustitución son aquellas en las que al menos un resto se ha retirado y un resto diferente se ha insertado en su lugar. Tales sustituciones por lo general se realizan de acuerdo con las siguientes Tablas 1 y 2 y se denominan sustituciones conservativas.
- 25 **[0213]** Los cambios sustanciales en la función o la identidad inmunológica se realizan mediante selección de sustituciones que son menos conservativas que las que aparecen en la Tabla 2, es decir, seleccionando restos que difieren de forma más significativa en su efecto en el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena principal del polipéptido en el área de sustitución, por ejemplo en forma de con formación de lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobia de la molécula en el sitio diana o (c) el volumen de la cadena lateral. Las sustituciones que en general se espera que produzcan los cambios más grandes en las propiedades de la proteína serán aquellas en las que (a) un resto hidrófilo, por ejemplo serilo o treonilo, está sustituido por (o con) un resto hidrófobo, por ejemplo leucilo, isoleucilo, fenilalanilo, valilo o alanilo; (b) una cisteína o prolina está sustituida por (o con) cualquier otro resto; (c) un resto que tiene una cadena lateral electropositiva, por ejemplo, lisilo, arginilo, o histidilo, está sustituido por (o con) un resto electronegativo, por ejemplo, glutamilo o aspartilo; o (d) un resto que tiene una cadena lateral voluminosa, por ejemplo, fenilalanina, está sustituido por (o con) uno que no tiene una cadena lateral, por ejemplo, glicina, en este caso, (e) mediante el aumento del número de sitios para sulfatación y/o glicosilación.

TABLA 1: Abreviaturas del Aminoácido

Aminoácido	Abreviaturas	
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutámico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F

Aminoácido	Abreviaturas	
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tvr	Y
Valina	Val	V

TABLA 2: Sustituciones de Aminoácido

Resto Original	Sustituciones Conservativas a modo de Ejemplo*
Ala	Ser
Arg	Lys; Gln
Asn	Gln; His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn; Lys
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn; Gln
Ile	Leu; Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln
Met	Leu; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
Pro	Gly
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu
* En la técnica se conocen otras	

5 **[0214]** Por ejemplo, los expertos en la materia conocen la sustitución de un resto de aminoácido con otro que es biológica y/o químicamente similar como una sustitución conservativa. Por ejemplo, una sustitución conservativa se produciría sustituyendo un resto hidrófugo por otro, o un resto polar por otro. La sustituciones incluyen combinaciones tales como, por ejemplo, Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; y Phe, Tyr. Tales variaciones sustituidas de forma conservativas de cada secuencia desvelada de forma explícita se incluyen dentro de los polipéptidos mosaico proporcionados en el presente documento.

10

**[0215]** Para insertar sitios para N-glicosilación (Asn-X-Thr/Ser) u O-glicosilación (Ser o Thr) se puede usar mutagénesis de sustitución o de supresión. Las supresiones de cisteína u otros restos lábiles también pueden ser deseables. Las supresiones o sustituciones de sitios de proteólisis potenciales, por ejemplo Arg, se consiguen por

ejemplo mediante supresión de uno de los restos básicos o mediante sustitución de uno con restos de glutaminilo o histidilo.

**[0216]** Ciertas derivatizaciones posteriores a la traducción son el resultado de la acción de células hospedadoras recombinantes en el polipéptido expresado. Los restos de glutaminilo y asparaginilo frecuentemente se desamidán después de la traducción a los correspondientes restos de glutamilo y asparilo. Como alternativa, estos restos se desamidán en condiciones ligeramente ácidas. Otras modificaciones después de la traducción incluyen hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de restos de serilo o treonilo, metilación de los grupos o-amino de cadenas laterales de lisina, arginina, e histidina (T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco pp 79-86, 1983), acetilación de la amina N-terminal y, en algunos casos, amidación del carboxilo C-terminal.

**[0217]** Se entiende que una manera de definir las variantes y derivados de las proteínas desveladas en el presente documento es a través de la definición de las variantes y derivados en términos de homología/identidad con respecto a secuencias específicas conocidas. De forma específica se desvelan variantes de proteínas desveladas en el presente documento que tienen una homología de al menos, un 60 %, 70 % o un 75 % o un 80 % o un 85 % o un 90 % o un 95 % con la secuencia indicada. Los expertos en la materia entienden fácilmente cómo determinar la homología de dos proteínas. Por ejemplo, la homología es recalcular después del alineamiento de las consecuencias de modo que la homología se encuentra en su nivel más elevado.

**[0218]** Otra forma de calcular la homología se puede realizar con algoritmos publicados. El alineamiento óptimo de las secuencias para comparación se puede realizar con el algoritmo de homología local de Smith y Waterman *Adv. Appl. Math.* 2: 482, 1981, con el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443, 1970, con el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444, 1988, con implementaciones informáticas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Paquete de Software de Genética de Wisconsin, Grupo de Informática Genética, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección.

**[0219]** Los mismos tipos de homología se pueden obtener para los nucleicos por ejemplo con los algoritmos desvelados en Zuker, *M. Science* 244: 48-52, 1989, Jaeger *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 7706-7710, 1989, Jaeger *et al.* *Methods Enzymol.* 183: 281-306, 1989.

**[0220]** Se entiende que la descripción de mutaciones conservativas y homología se pueden combinar en conjunto en cualquier combinación, tal como las realizaciones que tienen una homología de al menos un 70 % con una secuencia en particular en la que las variantes son mutaciones conservativas.

**[0221]** Como la presente memoria descriptiva discute diversas proteínas y secuencias de proteínas, se entiende que también se desvelan los ácidos nucleicos que codifican esas secuencias de proteínas. Estas incluirían todas las secuencias degeneradas o relacionadas con una secuencia de proteínas específicas, es decir, todos los ácidos nucleicos que tienen una secuencia que codifica una secuencia de proteínas en particular así como todos los ácidos nucleicos, que incluyen ácidos nucleicos degenerados, que codifican las variantes y derivados desvelados de las secuencias de proteínas. Por lo tanto, aunque cada secuencia de ácidos nucleicos en particular puede escribirse completa en el presente documento, se entiende que todas y cada una de las secuencias de hecho se desvela y se describe en el presente documento a través de la secuencia de proteínas desvelada. También se entiende aunque ninguna secuencia de aminoácidos indica qué secuencia de ADN en particular codifica esa proteína dentro del organismo, en el que algunas variantes en particular de la proteína desvelada se desvelan en el presente documento, la secuencia de ácidos nucleicos conocida que codifica esa proteína en la afecta en particular a partir de la que surge esa proteína también se conoce y se desvela y se describe en el presente documento.

**[0222]** Se entiende que existen numerosos análogos de aminoácidos y péptidos que se pueden incorporar en las composiciones desveladas. Por ejemplo, existen numerosos D aminoácidos o aminoácidos que tienen un sustituyente funcional diferente a los de los aminoácidos mostrados en la Tabla 1 y Tabla 2. Los estereoisómeros opuestos de péptidos de origen natural se desvelan, así como los estereoisómeros de análogos de péptidos. Estos aminoácidos se pueden incorporar fácilmente en cadenas politécnicas mediante la carga de moléculas de ARNt con el aminoácido de elección y construcciones de ingeniería genética que usan, por ejemplo, codones ámbar, para insertar el aminoácido análogo en una cadena peptídica de una manera específica del sitio (Thorson *et al.*, *Methods in Mol. Biol.* 77: 43-73, 1991, Zoller, *Curr. Opin. Biotech.*, 3: 348-354, 1992; Ibbá, *Biotechnol. Genet. Eng.* 13: 197-216, 1995, Cahill *et al.*, *Trends Biochem. Sci.*, 14: 400-403, 1989; Benner, *Trends Biotechnol.*, 12: 158-163, 1994).

**[0223]** Se pueden producir moléculas que se parecen a los péptidos, but pero que no se conectan a través de un enlace peptídico natural. Por ejemplo, los enlaces para aminoácidos o análogos de aminoácido pueden incluir  $\text{CH}_2\text{NH--}$ ,  $\text{--CH}_2\text{S--}$ ,  $\text{--CH}_2\text{--CH}_2\text{--}$ ,  $\text{--CH=CH--}$  (cis y trans),  $\text{--COCH}_2\text{--}$ ,  $\text{--CH(OH)CH}_2\text{--}$  y  $\text{--CHH}_2\text{SO--}$  (Estos y otros se pueden encontrar en Spatola, A. F. en *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins*, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, New York, p. 267, 1983; Spatola, A. F., *Vega Data* (marzo de 1983), Vol. 1, Artículo 3, *Peptide Backbone Modifications* (revisión general); Morley, *Trends Pharm. Sci.* 463-468, 1980; Hudson, D. *et al.*,

Int. J. Pept. Prot. Res. 14: 177-185, 1979 (--CH<sub>2</sub>NH--, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>--); Spatola *et al.* Life Sci. 38: 1243-1249, 1986 (--CH H<sub>2</sub>--S); Hann J. Chem. Soc. Perkin Trans. I 307-314, 1982 (--CH-CH--, cis y trans); Almquist *et al.* J. Med. Chem. 23: 1392-1398, 1980 (--COCH<sub>2</sub>--); Jennings-White *et al.* Tetrahedron Lett., 23: 2533, 1982 (--COCH<sub>2</sub>--); Szelke *et al.* *European Appln.*, EP 45665 CA: 97: 39405, 1982 (--CH(OH)CH<sub>2</sub>--); Holladay *et al.* Tetrahedron Lett. 24: 4401-4404, 5 1983 (--C(OH)CH<sub>2</sub>--); y Hruby Life Sci. 31: 189-199, 1982 (--CH<sub>2</sub>--S--). Un enlace no peptídico particularmente preferente es --CH<sub>2</sub>NH--. Se entiende que los análogos de péptido pueden tener más de un átomo entre los átomos del enlace, tales como b-alanina, ácido g-aminobutírico, y similares.

**[0224]** Algunos análogos de aminoácido y análogos y análogos de péptidos a menudo tienen propiedades aumentadas o deseadas, tales como, producción más económica, mayor estabilidad química, mejores propiedades 10 farmacológicas (vida media, absorción, potencia con eficacia, etc.), alteración de la especificidad (por ejemplo, un amplio espectro de actividades biológicas), reducción de la antigenicidad y otros.

**[0225]** Algunos D-aminoácidos se pueden usar para generar péptidos más estables, porque los D aminoácidos no son reconocidos por las peptidasas y similares. La sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una 15 secuencia consenso con un D-aminoácido del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de L-lisina) se puede usar para generar péptidos más estables. Los restos de cisteína se pueden usar para ciclar o unir dos o más péptidos en conjunto. Esto puede ser beneficioso para limitar a los péptidos en conformaciones particulares. (Rizo y Gierasch Ann. Rev. Biochem. 61: 387, 1992).

## 20 6. Suplementos

**[0226]** En el presente documento también se desvelan suplementos nutricionales. Un suplemento nutricional es cualquier compuesto o composición que se puede administrar o ingerir por un sujeto para proporcionar, suministrar o 25 aumentar un nutriente o nutrientes (por ejemplo, vitaminas, minerales, elementos traza esenciales, aminoácidos, péptidos, ácidos nucleicos, oligonucleótidos, lípidos, colesterol, esteroides, carbohidratos, y similares). En un aspecto, en el presente documento se desvelan suplementos nutricionales que comprenden cualquiera de los compuestos desvelados en el presente documento. Por ejemplo, un suplemento nutricional puede comprender cualquiera de los lípidos desvelados en el presente documento. Los restos de ácidos grasos de estos lípidos pueden ser cualquier ácido graso de como se desvela en el presente documento (por ejemplo, restos de ácidos grasos 30 insaturados o saturados).

**[0227]** El suplemento nutricional puede comprender cualquier cantidad de los compuestos desvelados en el presente documento, pero por lo general contendrán una cantidad determinada para suministrar a un sujeto una dosis deseada de un derivado de bencenodiol (por ejemplo, CoQ<sub>10</sub>) y/o ácidos grasos. La cantidad exacta de compuesto 35 necesaria en el suplemento nutricional variará de sujeto a sujeto, dependiendo de la especie, edad, peso y estado general del sujeto, la gravedad de la deficiencia dietética que se está tratando, el modo de administración en particular, y similares. Por lo del tanto, no es posible especificar una cantidad exacta para cada suplemento nutricional. Sin embargo, una cantidad apropiada la puede determinar un experto habitual en la materia usando solamente experimentación de rutina dadas las enseñanzas en el presente documento. En un ejemplo específico, un 40 suplemento nutricional puede comprender de aproximadamente un 0,05 % a aproximadamente un 20 %, de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 7,5 %, o de aproximadamente un 3 % a aproximadamente un 5 % en peso del compuesto. En otro ejemplo, el suplemento nutricional puede comprender de aproximadamente un 0,05, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25, 0,30, 0,35, 0,40, 0,45, 0,50, 0,55, 0,60, 0,65, 0,70, 0,75, 0,80, 0,85, 0,90, 0,95, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0, 13,5, 14,0, 45 14,5, 15,0, 15,5, 16,0, 16,5, 17,0, 17,5, 18,0, 18,5, 19,0, 19,5, o 20,0 % en peso del compuesto, en el que cualquiera de los valores indicados puede formar un criterio de valoración superior o inferior cuando sea apropiado. En otro aspecto, con respecto al suplemento nutricional, el suplemento puede estar formado por hasta un 100 % del suplemento.

50 **[0228]** El suplemento nutricional también puede comprender otro u otros nutrientes, tales como vitaminas, elementos traza, minerales, y similares. Además, el suplemento nutricional puede comprender otros componentes tales como conservantes, agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, espesantes, aromatizantes, diluyentes, emulgentes, adyuvantes de dispersión y/o aglutinantes.

55 **[0229]** Los suplementos nutricionales por lo general se toman generalmente por vía oral y se pueden presentar en cualquier forma adecuada para administración oral. Por ejemplo, un suplemento nutricional se puede presentar por lo general en una forma de comprimido, cápsula de gel, cápsula, líquido, bolsitas, o jarabe.

## 60 7. Dispositivos de Suministro

**[0230]** Cualquiera de los compuestos descritos en el presente documento se pueden incorporar en un dispositivo de suministro. Algunos ejemplos de dispositivos de suministro incluyen, pero no se limitan a, microcápsulas, 65 microesferas, nanoesferas o nanopartículas, liposomas, noisoma, nanoeritosoma, nanopartículas de sólido-líquido, geles, cápsulas de gel, comprimidos, lociones, cremas, pulverizaciones, o emulsiones. Otros ejemplos de dispositivos de suministro que son adecuados para administración no oral incluyen pulmoesferas. Algunos ejemplos

de dispositivos de suministro en particular útiles en el presente documento se describen a continuación.

**[0231]** Los compuestos desvelados se pueden incorporar en liposomas. Como se sabe en la técnica, los liposomas por lo general se derivan de fosfolípidos y otras sustancias lipídicas. Los liposomas están formados por cristales  
5 líquidos hidratados mono o multilaminares que se dispersan en un medio acuoso. Se puede utilizar cualquier lípido no tóxico, fisiológicamente aceptable y metabolizable capaz de formar liposomas. Las composiciones desveladas en forma de liposoma pueden contener, en además de un compuesto desvelado en el presente documento, agentes estabilizantes, conservantes, excipientes, y similares. Algunos ejemplos de lípidos adecuados son los fosfolípidos y las fosfatidilcolinas (lecitinas), tanto naturales como sintéticos. En la técnica se conocen algunos métodos para  
10 formar liposomas. Véase, por ejemplo, Prescott, Ed., *Methods in Cell Biology*, Volumen XIV, Academic Press, New York, p. 33 y sucesivas, 1976.

**[0232]** En otros ejemplos, los liposomas pueden ser liposomas catiónicos (por ejemplo, DOTMA, DOPE, colesterol DC) o liposomas aniónicos. Los liposomas pueden comprender adicionalmente proteínas para facilitar la orientación  
15 de una célula en particular, si se desea. La administración de una composición que comprende un compuesto y un liposoma catiónico se puede administrar a la de sangre aferente a un órgano diana o se pueden inhalar en las vías respiratorias para células diana del tracto respiratorio. Con respecto a liposomas, véanse por ejemplo, Brigham, *et al.*, *Am J Resp Cell Mol Biol* 1: 95-100, 1989; Felgner, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 84:7413-7, 1987; y Pat. de Estados Unidos n.º 4.897.355. Como un ejemplo, el suministro se puede realizar a través de un liposoma, usando  
20 preparaciones de liposomas disponibles en el mercado tales como LIPOFECTIN, LIPOFECTAMINE (GIBCO-BRL, Inc., Gaithersburg, MD), SUPERFECT (Qiagen, Inc. Hilden, Alemania) y TRANSFECTAM (Promega Biotec, Inc., Madison, WI), así como otros liposomas desarrollados de acuerdo con procedimientos convencionales en la técnica. También se pueden usar algunos liposomas en los que la difusión del compuesto o suministro del compuesto desde el liposoma están diseñados para una tasa de dosificación específica.

**[0233]** Como se describe en el presente documento, los noisomas son dispositivos de suministro que se pueden usar para suministrar las composiciones desveladas en el presente documento. Los noisomas son vesículas multilamelares o unilamelares que involucran a agentes tensioactivos no iónicos. Una solución acuosa de soluto está encerrada por una bicapa resultante de la organización de macromoléculas de tensioactivo. Al igual que los  
30 liposomas, los noisomas se usan en la administración dirigida de, por ejemplo, fármacos anticáncer, que incluyen metotrexato, doxorubicina e inmunoadyuvantes. Por lo general se entiende que son diferentes a los transferosomas, vesículas preparadas a partir de polímeros que contienen carbohidrato anfifílico y grupo amino, por ejemplo, quitosano.

**[0234]** Como se describe en el presente documento, los nanoeritrosomas son dispositivos de suministro que se pueden usar para suministrar las composiciones desveladas en el presente documento. Los nanoeritrosomas son nanovesículas formadas por glóbulos rojos mediante diálisis a través de filtros de tamaño de poro definido. Estas vesículas se pueden cargar con una matriz diversa de moléculas biológicamente activas, incluyendo las proteínas y las composiciones desveladas en el presente documento. Por lo general, sirven como vehículos ideales para  
40 agentes antineoplásicos tales como bleomicina, actinomicina D, pero se pueden usar para esteroides, otros lípidos, etc.

**[0235]** Los glóbulos rojos artificiales, como se describe en el presente documento, son dispositivos de suministro adicionales que se pueden usar para suministrar las composiciones desveladas en el presente documento. Los  
45 glóbulos rojos artificiales se pueden generar mediante métodos de polimerización interfacial y de emulsión de complejos. Por lo general, la pared "celular" está formada por polímero de polifitaloil L-lisina/poliestireno y el núcleo está formado por una solución de hemoglobina a partir de hemolizado de oveja. Las microesferas cargadas con hemoglobina por lo general tienen un tamaño de partícula de 1 a aproximadamente 10 µm. Su tamaño, flexibilidad, capacidad de transporte de oxígeno es similar al de los glóbulos rojos.

**[0236]** Las nanopartículas de sólido-lípidos, como se describe en el presente documento, son otros dispositivos de suministro que se pueden usar para entregar las composiciones desveladas en el presente documento. Las nanopartículas de sólido-lípido son nanopartículas que se dispersan en una solución acuosa de tensioactivo. Están formadas por un núcleo hidrófobo sólido que tiene una monocapa de un revestimiento de fosfolípidos y normalmente  
55 se preparan con técnicas de homogeneización a alta presión. Los complejos de inmunomodulación (ISCOM) son ejemplos de nanopartículas de sólido-lípido. Son ensamblajes supramoleculares de 40 nm con forma de jaula que están formados por fosfolípidos, colesterol y antígenos hidrófobos y se usan principalmente como inmunoadyuvantes. Por ejemplo, los ISCOM se usan para aumentar los niveles en plasma de la sangre de ciclosporina inyectada por vía subcutánea.

**[0237]** Las microesferas y microcápsulas, como se describe en el presente documento, son también otro dispositivo de suministro que se pueden usar para suministrar las composiciones desveladas en el presente documento. A diferencia de los sistemas de suministro de liposomas, las microesferas y microcápsulas por lo general no tienen un núcleo acuoso, sino una matriz de polímero sólida o polímero de membrana. Estos dispositivos de suministro se  
65 obtienen mediante precipitación controlada de polímeros, reticulación química de polímeros solubles, y

- polimerización interfacial de dos monómeros o técnicas de homogeneización a alta presión. El compuesto encapsulado se libera gradualmente desde el depósito mediante erosión o difusión de las partículas. Se han desarrollado algunas formulaciones satisfactorias de péptidos de acción corta, tales como los agonistas de LHRH como leuprorelina y triptorelina. Las microesferas de poli(lactida co-glicólido (PLGA) se usan en la actualidad como
- 5 formas de dosificación mensual y de tres meses en el tratamiento de cáncer de próstata avanzado, endometriosis, y otras afecciones sensibles a hormonas. El leuprolide, un superagonista de LHRH, se incorporó en una diversidad de matrices de PLGA usando un método de extracción/evaporación de disolvente. Como se ha indicado, todos estos dispositivos de suministro se pueden usar en los métodos desvelados en el presente documento.
- 10 **[0238]** Las pulmoesferas son también otros ejemplos de dispositivos de administración que se pueden usar en el presente documento. Las pulmoesferas son partículas huecas y porosas con una baja densidad (inferior a aproximadamente  $0,1 \text{ m ml}^{-1}$ ). Por lo general, las pulmoesferas tienen capacidad de redispersión excelente y por lo general se preparan con la tecnología de condensación de fluidos supercríticos. El co-secado por pulverización de ciertas matrices, tales como carbohidratos, albúmina de suero humano, etc., puede mejorar la estabilidad de las
- 15 proteínas y péptidos (por ejemplo, insulina) y otras biomoléculas para administración por vía pulmonar. Este tipo de administración también se podría conseguir con microemulsiones y emulsiones lipídicas, que son emulsiones ultrafinas, delgadas, de aceite en agua transparentes (W/O) formadas de forma espontánea sin entrada significativa de energía mecánica. En esta técnica, una emulsión se puede preparar a una temperatura, que debe ser superior a la temperatura de inversión de fases del sistema. A temperatura elevada, la emulsión es de tipo agua en aceite (w/o)
- 20 y a medida que se enfría a la temperatura de inversión de fase, esta emulsión se invierte para convertirse en (o/w). Debido a sus fases internas muy pequeñas, que son extremadamente estables y se usan para la liberación sostenida de esteroides y vacunas. Las emulsiones lipídicas comprenden un núcleo de lípidos neutros (es decir, triglicéridos) estabilizado con una monocapa de lípido anfílico (es decir, fosfolípido) usando tensioactivos tales como triglicéridos de lecitina de huevo y Miglyol. Son adecuados para la dirección pasiva y activa.
- 25 **[0239]** Existen otros sistemas de administración oral en investigación que se basan en la modulación de la presión osmótica, modulación del pH, modulación de la inflamación, alteración de la densidad y sistemas flotantes, capacidad de mucoadhesión, etc. Estas formulaciones y formulaciones retardadas en el tiempo para la administración de fármacos de acuerdo con el ritmo circadiano de la enfermedad que en la actualidad están en uso o
- 30 investigación se puede aplicar para la administración de las composiciones desveladas en el presente documento.
- [0240]** En un aspecto en particular desvelado en el presente documento, los compuestos desvelados, que incluyen suplementos nutricionales y formulaciones farmacéuticas de los mismos, se pueden incorporar en microcápsulas como se describe en el presente documento.
- 35 **[0241]** En un aspecto desvelado en el presente documento, los compuestos desvelados se pueden incorporar en microcápsulas. En un aspecto, la microcápsula comprende una aglomeración de microcápsulas primarias y los compuestos de cromo descritos en el presente documento, teniendo cada microcápsula primaria individual una cubierta primaria, en la que el compuesto de cromo está encapsulado por la cubierta primaria, en la que la aglomeración está encapsulada por una cápsula externa. En el presente documento estas microcápsulas se denominan "microcápsulas de múltiples núcleos".
- 40 **[0242]** En otro aspecto, en el presente documento se describen microcápsulas que comprenden un compuesto de cromo, una cubierta primaria, y una cubierta secundaria, en las que la cubierta primaria encapsula al compuesto de cromo, y la cubierta secundaria encapsula a la sustancia de carga y la cubierta primaria. En el presente documento estas microcápsulas se denominan "microcápsulas de un solo núcleo".
- 45 **[0243]** Opcionalmente, otras sustancias de carga se pueden encapsular con el compuesto de cromo. La sustancia de carga puede ser cualquier sustancia que no sea totalmente soluble en la mezcla acuosa. En un aspecto, la sustancia de carga es un sólido, un líquido hidrófobo, o una mezcla de un sólido y un líquido hidrófobo. En otro aspecto, la sustancia de carga comprende una grasa, un aceite, un líquido, un fármaco (por ejemplo, molécula pequeña), una sustancia biológicamente activa, un suplemento nutricional (por ejemplo, vitaminas), un compuesto saborizante, o una mezcla de los mismos. Algunos ejemplos de aceites incluyen, pero no se limitan a, aceites de animales (por ejemplo, aceite de pescado, aceite de mamífero marino, etc.), aceites vegetales (por ejemplo, canola o
- 50 colza), aceite minerales, derivados de los mismos o mezclas de los mismos. La sustancia de carga puede ser una sustancia oleosa purificada o parcialmente purificada tal como un ácido graso, un triglicérido o éster del mismo, o una mezcla de los mismos. En otro aspecto, la sustancia de carga puede ser un carotenoide (por ejemplo, licopeno), un agente de saciedad, un compuesto saborizante, un fármaco (por ejemplo, un fármaco insoluble en agua), una partícula, un agente químico agrícola (por ejemplo, herbicidas, insecticidas, fertilizantes), o un ingrediente de
- 55 acuicultura (por ejemplo, alimentos, pigmento).
- 60 **[0244]** En un aspecto, la sustancia de carga puede ser un ácido graso omega-3. Algunos ejemplos de ácidos grasos omega-3 incluyen, pero no se limitan a, ácido  $\alpha$ -linolénico (18:3n3), ácido octadecatetraenoico (18:4n3), ácido eicosapentaenoico (20:5n3) (EPA), ácido docosahexaenoico (22:6n3) (DHA), ácido docosapentaenoico (22:5n3)
- 65 (DPA), ácido eicosatetraenoico (20:4n3), ácido uncosapentaenoico (21:5n3), ácido docosapentaenoico (22:5n3) y

derivados de los mismos y mezclas de los mismos. En la técnica se conocen muchos tipos de derivados de ácidos grasos omega-3. Algunos ejemplos de derivados adecuados incluyen, pero no se limitan a, ésteres, tales como ésteres fitoesterol, ésteres de alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub> ramificados o sin ramificar, ésteres de alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>30</sub> ramificados o sin ramificar, o ésteres de cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>30</sub> ramificados o sin ramificar tales como ésteres de fitoesterol y ésteres de alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>. Algunas fuentes de aceite se pueden derivar de organismos acuáticos (por ejemplo, anchoas, capelán, bacalao del Atlántico, arenque del Atlántico, caballa del Atlántico, sábalo del Atlántico, salmónidos, sardinas, tiburón, atún, etc.) y plantas (por ejemplo, lino, vegetales, etc.) y microorganismos (por ejemplo, hongos y algas).

5 **[0245]** En un aspecto, la sustancia de carga puede contener un antioxidante. Algunos ejemplos de antioxidantes incluyen, pero no se limitan a, vitamina E, CoQ<sub>10</sub>, tocoferoles, derivados solubles de lípido de antioxidantes más polares tales como ésteres de ácido graso de ascorbilo (por ejemplo, palmitato de ascorbilo), extractos de plantas  
10 (por ejemplo, aceites de romero, salvia y orégano), extractos de algas, y antioxidante sintéticos (por ejemplo, BHT, TBHQ, etoxiquina, galatos de alquilo, hidroquinonas, tocotrienoles).

**[0246]** Para producir las capas de cubierta de las microcápsulas de un solo núcleo y de múltiples núcleos se puede  
15 usar un número de diferentes polímeros. Algunos ejemplos de tales polímeros incluyen, pero no se limitan a, una proteína, un polifosfato, un polisacárido, o una mezcla de los mismos. En otro aspecto, el material de cubierta usado para preparar las microcápsulas de un solo núcleo y de múltiples núcleos comprende adicionalmente. En otro  
20 aspecto, el material de cubierta usado para preparar microcápsulas de un solo núcleo y de múltiples núcleos comprende adicionalmente gelatina de tipo A, gelatina de tipo B, polifosfato, goma arábica, alginato, quitosano, carragenano, pectina, almidón, almidón modificado, alfa-lactoalbúmina, beta-lactoglobulina, ovoalbúmina, polisorbitón, maltodextrinas, ciclodextrinas, celulosa, metil celulosa, etil celulosa, hidropropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa, proteína de leche, proteína de suero, proteína de soja, proteína de colza, albúmina, quitina, polilactidas, poli-lactida-co-glicólidos, quitina derivatizada, quitosano, poli-lisina, diversos compuestos inorgánicos-  
25 orgánicos, o cualquier mezcla de los mismos. También se contempla que también se pueden usar algunos derivados de estos polímeros. En otro aspecto, el polímero puede ser gelatina kosher, gelatina no kosher, gelatina Halal o gelatina no Halal.

**[0247]** En un aspecto, una o más de las capas de cubierta en las microcápsulas de un solo núcleo o de múltiples  
30 núcleos comprende gelatina que tiene un índice de Bloom inferior a 50. En el presente documento esta gelatina se denomina "queratina de bajo índice de Bloom". El índice de Bloom describe la resistencia del gel formado a 10 °C con una solución de un 6,67 % gelificada durante 18 horas. En un aspecto, la gelatina de bajo índice de Bloom tiene un índice de Bloom inferior a 40, inferior a 30, inferior a 20, o inferior a 10. En otro aspecto, la gelatina tiene un índice de Bloom de 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, o 0, en el que cualquiera de dos valores se puede  
35 usar para producir un intervalo. En otro aspecto, la gelatina de bajo índice de Bloom está tanto en la cubierta primaria como en la cubierta externa de la microcápsula de múltiples núcleos. En un aspecto, la gelatina de bajo índice de Bloom es gelatina de tipo A. En otro aspecto, la gelatina de bajo índice de Bloom es gelatina de tipo A producida por Kenney y Ross Ltd., R.R. n.º3 Shelburne, NS Canadá. En otro aspecto, la gelatina que tiene un índice de Bloom de cero está tanto en la cubierta primaria como en la cubierta externa de la microcápsula de múltiples  
40 núcleos.

**[0248]** En un aspecto, el material usado para preparar las cubiertas de las microcápsulas de un solo núcleo o de  
múltiples núcleos es un sistema de dos componentes preparado a partir de una mezcla de dos tipos de polímeros diferentes. En un aspecto, el material es un coacervado de complejo entre los componentes poliméricos. La  
45 coacervación de complejo está causada por la interacción entre dos polímeros de cargas opuestas. En un aspecto, el material de cubierta usado para producir las microcápsulas de un solo núcleo o de múltiples núcleos está formado por (1) gelatina de bajo índice de Bloom y (2) gelatina de tipo B, polifosfato, goma arábica, alginato, quitosano, carragenano, pectina, carboximetilcelulosa, proteína de suero, proteína de soja, proteína de colza, albúmina, o una  
50 mezcla de los mismos. La proporción molar de los diferentes polímeros puede variar. Por ejemplo, la proporción molar de la gelatina de bajo índice de Bloom con respecto al otro componente del polímero es de 1:5 a 15:1. Por ejemplo, cuando se usan gelatina de bajo índice de Bloom y polifosfato, la proporción molar de la gelatina de bajo índice de Bloom con respecto a polifosfato es de aproximadamente 8:1 a aproximadamente 12:1; cuando se usan gelatina de bajo índice de Bloom y gelatina de tipo B, la proporción molar es de 2:1 a 1:2; y cuando se usan gelatina de bajo índice de Bloom y alginato, la proporción molar es de 3:1 a 8:1.

**[0249]** Los adyuvantes de procesamiento se pueden incluir en el material de cubierta (por ejemplo, cubiertas  
55 primaria o exterior). Los adyuvantes de procesamiento se pueden usar por una variedad de razones. Por ejemplo, se pueden usar para promover la aglomeración de las microcápsulas primarias, estabilizar el sistema de emulsión, mejorar las propiedades de las cubiertas externas, controlar el tamaño de la microcápsula y/o para actuar como un antioxidante. En un aspecto, el adyuvante de procesamiento puede ser un agente emulgente, un ácido graso, un  
60 lípido, una cera, una célula microbiana (por ejemplo, líneas de células de levadura), una arcilla, o un compuesto inorgánico (por ejemplo, carbonato cálcico). No deseando quedar ligado por la teoría, estos adyuvantes de procesamiento pueden mejorar las propiedades de barrera de las microcápsulas. En un aspecto, uno o más antioxidantes se pueden añadir al material de cubierta. Las propiedades antioxidantes son útiles tanto durante el proceso (por ejemplo, durante la coacervación y/o secado por pulverización) y en las microcápsulas después de que  
65 se hayan formado (es decir, para prolongar la vida útil, etc). Preferentemente, se puede usar un pequeño número de

adyuvantes de procesamiento que realizan un gran número de funciones. En un aspecto, el antioxidante puede ser un compuesto fenólico, un extracto de planta, o un aminoácido que contiene azufre. En un aspecto, se puede usar ácido ascórbico (o una de sus sales tales como ascorbato sódico o potásico) para promover la aglomeración de las microcápsulas primarias, para controlar el tamaño de microcápsula y para actuar como un antioxidante. El

5 antioxidante se puede usar en una cantidad de aproximadamente 100 ppm a aproximadamente 12.000, o de aproximadamente 1.000 ppm a aproximadamente 5.000 ppm. También se pueden usar otros adyuvantes de procesamiento, tales como, por ejemplo, quelantes de metales. Por ejemplo, el ácido etileno diamino tetraacético se puede usar para unirse a iones metálicos, que puede reducir la oxidación catalítica de la sustancia de carga.

10 **[0250]** En un aspecto, las microcápsulas primarias (cubiertas primarias) tienen un diámetro medio de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , de 0,1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , de 1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , de 1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 8  $\mu\text{m}$ , de 1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 6  $\mu\text{m}$ , de 1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 4  $\mu\text{m}$ , o de 1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 2  $\mu\text{m}$ , o 1  $\mu\text{m}$ . En otro aspecto, las microcápsulas de múltiples núcleos pueden tener un diámetro medio de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 2000  $\mu\text{m}$ , de 20  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 1000  $\mu\text{m}$ , de aproximadamente 20  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ , o de

15 aproximadamente 30  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 80  $\mu\text{m}$ . En otro aspecto, las microcápsulas de un solo núcleo tienen un diámetro externo de 1  $\mu\text{m}$  a 2.000  $\mu\text{m}$ .

**[0251]** Las microcápsulas descritas en el presente documento por lo general tienen una combinación de carga y resistencia estructural elevadas. Por ejemplo, algunas cargas de sustancia de carga pueden ser de un 20 % a un

20 90 %, de un 50 % a un 70 % en peso, o de un 60 % en peso de las microcápsulas individuales o de varios núcleos.

**[0252]** En un aspecto, los métodos descritos en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 2003/0193102 se pueden usar para encapsular los lípidos de algas que se describen en el presente documento. También se contempla que una o más capas de cubierta adicionales se pueden colocar en la cubierta exterior de las

25 microcápsulas de un solo núcleo o de múltiples núcleos. En un aspecto, las técnicas que se describen en la Publicación Internacional n.º WO 2004/041251 A1, se pueden usar para añadir capas de cubiertas adicionales a las microcápsulas de un solo núcleo y de múltiples núcleos.

#### a) Composiciones farmacéuticas y nutracéuticas

30

**[0253]** Estos lípidos y antioxidantes están dirigidos a su uso en alimentos para animales, agentes farmacéuticos, agentes nutracéuticos (en especial fórmulas infantiles), así como en la industria. Estas también incluyen formas nutracéuticas de suministro tales como cápsulas de gel y similares, microencapsulaciones comunes, etc.

35 **[0254]** Como se ha descrito anteriormente, las composiciones también se pueden administrar *in vivo* en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por "farmacéuticamente aceptable" se entiende un material que no es biológicamente o de otro modo indeseable, es decir, el material se puede administrar a un sujeto, junto con el ácido nucleico o vector, sin causando ningún efecto biológico indeseable ni interactuar de una manera perjudicial con cualquiera de los otros componentes de la composición farmacéutica en la que está contenido. El vehículo se seleccionaría de

40 forma natural para minimizar cualquier degradación del principio activo y para minimizar cualquier efecto secundario adverso en el sujeto, como no conocería un experto en la materia.

**[0255]** Las composiciones se pueden administrar por vía oral, por vía parenteral (por ejemplo, por vía intravenosa), por inyección intramuscular, por inyección intraperitoneal, por vía transdérmica, por vía extracorpórea, por vía tópica

45 o similares, incluyendo la administración intranasal tópica o administración por inhalación. Como se usa en el presente documento, "administración tópica intranasal" se refiere a la administración de las composiciones en la nariz y los conductos nasales a través de uno o ambos de los orificios nasales y puede comprender la administración mediante un mecanismo de pulverización o mecanismo de formación de gotitas, o a través de aerosolización del ácido nucleico o vector. La administración de las composiciones mediante inhalación se puede realizar a través de la

50 nariz o la boca mediante administración con un mecanismo de pulverización o gotas. La administración también se puede realizar directamente a cualquier área del sistema respiratorio (por Ejemplo, pulmones) a través de intubación. La cantidad exacta de las composiciones requerida variará de sujeto a sujeto, dependiendo de la especie, edad, peso y estado general del sujeto, la gravedad del trastorno alérgico que se está tratando, el ácido nucleico o vector en particular usados, su modo de administración y similares. Por lo tanto, no es posible especificar una cantidad

55 exacta para cada composición. Sin embargo, una cantidad apropiada la puede determinar un experto habitual en la materia usando solamente experimentación de rutina dadas las enseñanzas en el presente documento.

**[0256]** La administración parenteral de la composición, si se usa, se caracteriza generalmente por inyección. Los inyectables se pueden preparar en formas convencionales, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas, formas

60 sólidas adecuadas para solución de la suspensión en líquido antes de la inyección, o en forma de emulsiones. Un enfoque revisado más recientemente para administración parenteral implica el uso de un sistema de liberación lenta o de liberación sostenida de modo que se mantiene una dosificación constante. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 3.610.795.

65 **[0257]** Los materiales pueden estar en disolución, suspensión (por ejemplo, incorporados en micropartículas,

liposomas, o células). Estos se pueden dirigir a un tipo de célula en particular a través de anticuerpos, receptores, o ligandos de receptor. Las siguientes referencias son ejemplos del uso de esta tecnología para dirigir proteínas específicas para tejido tumoral (Senter, *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 2: 447-451,1991; Bagshawe, K.D., *Br. J. Cancer*, 60: 275-281,1989; Bagshawe, *et al.*, *Br. J. Cancer*, 58: 700-703,1988; Senter, *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 4: 3-9,1993; Battelli, *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.*, 35: 421-425,1992; Pietersz y McKenzie, *Immunolog. Reviews*, 129: 57-80,1992; y Roffler, *et al.*, *Biochem. Pharmacol.*, 42: 2062-2065,1991). Algunos vehículos tales como otros liposomas "ocultos" y otros liposomas conjugados con anticuerpo (incluyendo fármaco con medicación que se realizan dirige a carcinoma de colon), dirección mediada por receptor de ADN a través de de ligandos específicos de células, dirección al tumor dirigida por linfocitos, y dirección retroviral terapéutica altamente específica de las células glicoma murino *in vivo*. Las siguientes referencias son ejemplos del uso de esta tecnología para dirigir proteínas específicas a tejido tumoral (Hughes *et al.*, *Cancer Research*, 49: 6214-6220,1989); y Litzinger y Huang, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1104: 179-187, 1992). En general, los receptores están implicados en las rutas de endocitosis, ya sea constitutiva o inducida por ligando. Estos receptores se agrupan en depresiones revestidas con clatrina, entran en la célula a través de vesículas revestidas con clatrina, pasan a través de un endosoma acidificado en el que se clasifica los receptores, y a continuación se reciclan a la superficie celular, se llevan a almacenar por vía intracelular, o se degradan en los lisosomas. Las vías de internalización sirven para una diversidad de funciones, tales como absorción de nutrientes, eliminación de proteínas activadas, eliminación de macromoléculas, entrada oportunista de virus y toxinas, disociación y degradación del ligando y regulación del nivel del receptor. Muchos receptores siguen más de una ruta intracelular, dependiendo del tipo de célula, concentración del receptor, tipo de ligando, valencia del ligando y concentración del ligando. Los mecanismos moleculares y celulares de la endocitosis mediada por receptor sea revisado (Brown y Greene, *DNA and Cell Biology* 10: 399-409, 1991).

#### (1) Vehículos Farmacéuticamente Aceptables

25 **[0258]** Las composiciones, incluyendo los anticuerpos, se pueden usar de forma terapéutica en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

**[0259]** Algunos vehículos adecuados y sus formulaciones se describen en Remington: The Science and Practice of Pharmacy (19<sup>a</sup> ed.) Ed. ARKANSAS. Gennaro, Mack Publishing Company, Easton, PA 1995. Por lo general, una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable se usa en la formulación para hacer que la formulación solución sea isotónica. Algunos del vehículo farmacéuticamente aceptable ejemplos incluyen, pero no se limitan a, solución salina, solución de Ringer y solución de dextrosa. El pH de la solución es preferentemente de 5 aproximadamente a aproximadamente 8, y más preferentemente de aproximadamente 7 a aproximadamente 7,5. Algunos vehículos adicionales incluyen preparaciones de liberación sostenida tales como matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, liposomas o micropartículas. Para los expertos en la materia será evidente que ciertos vehículos pueden ser más preferentes dependiendo, por ejemplo, de la vía de administración y la concentración de la composición que se está administrando.

40 **[0260]** Los expertos en la materia conocen algunos vehículos farmacéuticos. Por lo general, estos serían vehículos convencionales para la administración de fármacos a los seres humanos, incluyendo soluciones tales como agua estéril, solución salina y soluciones tamponadas a pH fisiológico. Las composiciones se pueden administrar por vía intramuscular o por vía subcutánea. Otros compuestos se administrarán de acuerdo con procedimientos convencionales usados por los expertos en la materia.

45 **[0261]** Las composiciones farmacéuticas pueden incluir vehículos, espesantes, diluyentes, tampones, conservantes, agentes tensoactivos y similares, además de la molécula de elección. Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir uno o más principios activos tales como agentes antimicrobianos, agentes antiinflamatorios, anestésicos, y similares.

50 **[0262]** La composición farmacéutica se puede administrar en un número de formas dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico y del área a ser tratada. La administración puede ser por vía tópica (incluyendo por vía oftálmica, vaginal, rectal, intranasal), por vía oral, por inhalación, o por vía parenteral, por ejemplo mediante goteo intravenoso, inyección subcutánea, intraperitoneal o intramuscular. Los anticuerpos desvelados se pueden administrar por vía intravenosa, por vía intraperitoneal, por vía intramuscular, por vía subcutánea, por vía intracavitaria, o por vía transdérmica.

60 **[0263]** Algunas preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones, y emulsiones, estériles acuosas o no acuosas. Algunos ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Algunos vehículos acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo solución salina y medios tamponados. Algunos vehículos parenterales incluyen cloruro sódico en solución, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, solución de Ringer lactada, o aceites no volátiles. Algunos vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer), y similares. También pueden estar presentes algunos conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo,

agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, y gases inertes y similares.

**[0264]** Las formulaciones para administración tópica pueden incluir pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, aerosoles, líquidos y polvos. Pueden ser necesarios o deseables algunos vehículos farmacéuticos 5 convencionales, bases acuosas, en polvo u oleosas, agentes espesantes y similares.

**[0265]** Algunas composiciones para administración oral incluyen polvos o gránulos, suspensiones o soluciones en medios acuoso o no acuosos, cápsulas, bolsitas, o comprimidos. Pueden ser deseables agentes espesantes, 10 saborizantes, diluyentes, emulgentes, adyuvantes de dispersión o aglutinantes.

**[0266]** Algunas de las composiciones se pueden administrar potencialmente como una sal de adición de base o ácido farmacéuticamente aceptable, formada por reacción con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido perclórico, ácido nítrico, ácido tiocianico, ácido sulfúrico, y ácido fosfórico, y ácidos orgánicos tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido oxálico, 15 ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico; y ácido fumárico, o mediante reacción con una base inorgánica tal como hidróxido sódico, hidróxido amónico, hidróxido potásico, y bases orgánicas tales como mono, di, trialkil y aril aminas y etanolaminas sustituidas.

## (2) Usos Terapéuticos

**[0267]** Las dosificaciones y programas eficaces para la administración de las composiciones se puede determinar de forma empírica, y la realización de tales determinaciones está dentro de la experiencia en la materia. Los intervalos de dosificación para la administración de las composiciones son aquellos lo suficientemente grandes para producir el efecto deseado se ven afectados los síntomas de trastorno. La dosificación no debería ser tan grande como para 25 causar efectos secundarios adversos, tales como reacciones cruzadas no deseadas, reacciones anafilácticas, y similares. Por lo general, la dosificación variará con la edad, condición, sexo y alcance de la enfermedad en el paciente, la vía de administración, o si otros medicamentos están incluidos en el régimen, y no puede determinar un experto en la materia. La dosificación la puede ajustar el médico individual en el caso de cualquier contraindicación. La dosificación puede variar, y se puede administrar en una o más administraciones de dosis diariamente, durante 30 uno o varios días. Algunas directrices se pueden encontrar en la bibliografía para dosis apropiadas para clases dadas de productos farmacéuticos. Por ejemplo, algunas directrices sobre la selección de dosis apropiadas para anticuerpos se pueden encontrar en la bibliografía sobre usos terapéuticos de anticuerpos, por ejemplo, Handbook of Monoclonal Antibodies, Ferrone *et al.*, eds., Noyes Publications, Park Ridge, N.J., (1985) ch. 22 y pp. 303-357; Smith *et al.*, Antibodies in Human Diagnosis and Therapy, Haber *et al.*, eds., Raven Press, New York (1977) pp. 365-389. 35 Una dosificación diaria habitual del anticuerpo usado solo podría variar de aproximadamente 1 µg/kg hasta 100 mg/kg de peso corporal o más al día, dependiendo de los factores mencionados anteriormente.

## b) Administración dirigida

**[0268]** Los liposomas y microcápsulas desvelados se pueden dirigir a un tipo de célula en particular, tales como células de los islotes, a través de anticuerpos, receptores o ligandos de receptor. Las siguientes referencias son ejemplos del uso de esta tecnología para tejido específico de diana (Senter, *et al.*, Bioconjugate Chem 2: 447-51, 1991; Bagshawe, Br J Cancer 60: 275-81, 1989; Bagshawe, *et al.*, Br J Cancer 58: 700-3, 1988; Senter, *et al.*, Bioconjugate Chem 4: 3-9, 1993; Battelli, *et al.*, Cancer Immunol Immunother 35: 421-5, 1992; Pietersz y McKenzie, 45 Immunolog Reviews 129: 57-80, 1992; y Roffler, *et al.*, Biochem Pharmacol 42: 2062-5, 1991). Estas técnicas se pueden usar para una diversidad de otros tipos de células específicas.

## 8. Productos alimenticios

**[0269]** En el presente documento también se desvelan productos alimenticios que comprenden cualquiera de las microcápsulas y emulsiones, desveladas en el presente documento. Por "producto alimenticio" se hace referencia a cualquier artículo que se puede consumir (por ejemplo, comer, beber o ingerir) por un sujeto. En un aspecto, las microcápsulas se pueden usar como suplementos nutricionales para un producto alimenticio. Por ejemplo, las microcápsulas emulsiones se pueden cargar con vitaminas, ácidos grasos omega-3, y otros compuestos que 55 proporcionen beneficios para la salud. En un aspecto, el producto alimenticio es una mercancía cocinada, una pasta, un producto cárnico, un producto lácteo congelado, un producto de leche, un producto de queso, un producto de huevo, un condimento, una mezcla para sopa, un alimento de aperitivo, un producto de frutos secos, un producto de proteína vegetal, un caramelo duro, un caramelo blando, un producto de aves de corral, un zumo de frutas procesado, un azúcar granulado, una salsa, una salsa espesa, un jarabe, una barra nutricional, una bebida, un polvo 60 seco para bebida, una mermelada o confitura, un producto de pescado, un alimento para animal de compañía. En otro aspecto, el producto alimenticio es pan, tortillas, cereales, salchichas, pollo, helado, yogur, leche, aderezos para ensalada, salvado de arroz, zumo de fruta, un polvo seco para bebida, bollos, galletas, galletas saladas, alimento de aperitivo, tartas de frutas, o bizcochos.

## 65 9. Chips y micromatrices

**[0270]** Se desvelan chips en los que al menos una dirección es de las secuencias o parte de las secuencias expuestas en cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos desveladas en el presente documento. También se desvelan chips en los que al menos una dirección es de las secuencias o secuencias expuestas en cualquiera de las 5 secuencias de péptidos desveladas en el presente documento.

**[0271]** También se desvelan chips en los que al menos una dirección es de una variante de las secuencias o parte de las secuencias expuestas en cualquiera de las secuencias de ácido nucleico desveladas en el presente documento. También se desvelan chips en los que al menos una dirección es de una variante de las secuencias o 10 parte de las secuencias expuestas en cualquiera de las secuencias de péptidos desveladas en el presente documento.

#### 10. Medios de lectura por ordenador

15 **[0272]** Se entiende que los ácidos nucleicos y proteínas desvelados se pueden representar como una secuencia que consiste en los nucleótidos de aminoácidos. Hay una variedad de maneras para mostrar estas secuencias, por ejemplo, el nucleótido guanosina se puede representar por G o g. De forma análoga, el aminoácido valina se puede representar por Val o V. Los expertos en la materia entienden cómo presentar y expresar cualquier secuencia de 20 ácido nucleico o secuencia en cualquiera de la variedad de formas que existen, cada una de las cuales se considera desvelada en el presente documento. De forma específica, en el presente documento se contempla la visualización de estas secuencias en medios de lectura por ordenador, tales como, los discos flexibles, cintas, chips, discos duros, discos compactos y discos de video, disponibles en el mercado, u otros medios de lectura por ordenador. También se desvelan las representaciones del código binario de las secuencias desveladas. Los expertos en la materia entienden lo que son los medios de lectura por ordenador. Por lo tanto, algunos medios de lectura por ordenador 25 sobre los que se registran, almacenan o salvan las secuencias de ácidos nucleicos o proteínas.

**[0273]** Se desvelan medios de lectura por ordenador que comprenden las secuencias e información con respecto a las secuencias que se exponen en el presente documento.

#### 30 11. Kits

**[0274]** En el presente documento se desvelan kits que se conciben para reactivos que se pueden usar en la práctica de los métodos desvelados en el presente documento o para el uso o mantenimiento de las composiciones desveladas en el presente documento. Los kits pueden incluir cualquier reactivo o combinación de reactivos 35 discutidos en el presente documento o que se entendería que son necesarios o beneficiosos en la práctica de los métodos desvelados. Por ejemplo, los kits pueden incluir uno o más microorganismos eucariotas desvelados en el presente documento junto con, por ejemplo, medios para su mantenimiento. Los kits también pueden incluir, por ejemplo, los lípidos o antioxidantes, junto con medios para el uso o la administración de los mismos.

#### 40 12. Composiciones con funciones similares

**[0275]** Se entiende que las composiciones desveladas en el presente documento tienen ciertas funciones, tales como la producción de ciertas proporciones de lípidos. En el Presente documento se desvelan ciertos requisitos estructurales, genéticos y funcionales para desempeñar las funciones desveladas, y se entiende que hay una gran 45 diversidad de estructuras, antecedentes genéticos y antecedentes funcionales que pueden realizar la misma función que las relacionadas con las estructuras desveladas, y que estas estructuras por último conseguirán el mismo resultado, por ejemplo la producción de una determinada ración de lípidos.

#### D. Métodos para preparar las composiciones

50 **[0276]** Las composiciones desveladas en el presente documento y las composiciones necesarias para realizar los métodos desvelados se pueden preparar usando cualquier método conocido por los expertos en la materia para ese reactivo compuesto en particular a menos que se indica que de forma específica de ozono.

#### 55 1. Síntesis de ácido nucleico

**[0277]** Por ejemplo, los ácidos nucleicos, tales como, los oligonucleótidos a usar como cebadores se pueden preparar usando métodos convencionales de síntesis química o se pueden producir usando métodos enzimáticos o cualquier otro método conocido. Tales métodos pueden variar de digestión enzimática convencional seguido de 60 aislamiento de fragmento de nucleótido (véase por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989) Capítulos 5, 6) a métodos puramente sintéticos, por ejemplo, con el método de cianoetil fosforamidita usando un sintetizador de ADN System 1 Plus de Milligen o Beckman (por ejemplo, el Modelo 8700 de sintetizador automatizado de Milligen-Biosearch, Burlington, el Modelo 380B de MA o ABI). Algunos métodos de síntesis útiles para la preparación de 65 oligonucleótidos también se describen en Ikuta *et al.*, Ann. Rev. Biochem. 53: 323-356, 1984, (métodos de

fosfotriéster y fosfito-triéster), y Narang *et al.*, *Methods Enzymol.*, 65: 610-620, 1980, (método de fosfotriéster). Algunas moléculas de ácido nucleico proteicas se pueden preparar usando métodos conocidos tales como los que se describen en Nielsen *et al.*, *Bioconjug. Chem.* 5: 3-7, 1994.

## 5 2. Síntesis de péptidos

[0278] Un método para producir las proteínas desveladas es unir dos o más péptidos o polipéptidos juntos mediante técnicas de química de proteínas. Por ejemplo, los péptidos o polipéptidos se pueden sintetizar de forma química usando equipo de laboratorio disponible en la actualidad que usa cualquiera de química de Fmoc (9-  
10 fluorenilmetiloxycarbonilo) o Boc (terc-butiloxycarbonilo) (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA). Un experto en la materia puede apreciar fácilmente que un péptido o polipéptido correspondiente a las proteínas desveladas, por ejemplo, se puede sintetizar mediante reacciones químicas convencionales. Por ejemplo, un péptido o polipéptido se puede sintetizar y no escindir de su resina de síntesis mientras que el otro fragmento de un péptido o proteína se puede sintetizar y posteriormente escindir de la resina, exponiendo de este modo un grupo terminal que se bloquea  
15 funcionalmente en el otro fragmento. Por reacciones de condensación de péptidos, estos dos fragmentos se pueden unir covalentemente a través de un enlace peptídico en sus extremos de carboxilo y amino terminales, respectivamente, para formar un anticuerpo, o fragmento del mismo. (Grant GA (1992) *Synthetic Peptides: A User Guide*. W.H. Freeman y Co., N.Y. (1992); Bodansky M y Trost B., Ed. (1993) *Principles of Peptide Synthesis*. Springer-Verlag Inc., NY. Como alternativa, el péptido o polipéptido se sintetiza independientemente *in vivo* como se  
20 describe en el presente documento. Una vez aislados, estos péptidos o polipéptidos independientes se pueden unir para formar un péptido o fragmento del mismo a través de reacciones de condensación de péptidos similares.

[0279] Por ejemplo, la ligación enzimática de segmentos peptídicos clonados o sintéticos permita fragmentos peptídicos relativamente cortos a unir para producir fragmentos de péptidos más grandes, polipéptidos o dominios de  
25 proteínas completas (Abrahmsen L *et al.*, *Biochemistry*, 30: 4151, 1991). Como alternativa, la ligación química nativa de los péptidos sintéticos se puede usar para construir de forma sintética péptidos o polipéptidos grandes a partir de fragmentos de péptidos más cortos. Este método consiste en una reacción química de dos etapas (Dawson *et al.* *Science*, 266: 776-779, 1994). La primera etapa es la reacción quimioselectiva de un péptido-tioéster sintético sin protección con otro segmento de péptido no protegido que contiene un resto de Cys amino-terminal para dar un  
30 compuesto intermedio unido a tioéster como el producto inicial covalente. Sin un cambio en las condiciones de reacción, este compuesto intermedio experimenta una reacción intramolecular rápida, espontánea, para formar un enlace peptídico nativo en el sitio de la ligación (Baggiolini M *et al.* *FEBS Lett.* 307: 97-101, 1992; Clark-Lewis I *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269: 16075, 1994; Clark-Lewis I *et al.*, *Biochemistry*, 30: 3128, 1991; Rajarathnam K *et al.*, *Biochemistry* 33: 6623-30, 1994).

[0280] Como alternativa, los segmentos peptídicos no protegidos se unen químicamente cuando el enlace formado entre los segmentos de péptido como resultado de la ligación química es un enlace no natural (no peptídico) (Schnolzer, M *et al.* *Science*, 256: 221, 1992). Esta técnica se ha usado para sintetizar análogos de dominios de  
40 proteína así como grandes cantidades de proteínas relativamente puras con actividad biológica completa (de Lisle Milton RC *et al.*, *Techniques in Protein Chemistry IV*. Academic Press, New York, pp. 257-267, 1992).

## 3. Procesos para preparar las composiciones

[0281] Se desvelan procesos para preparar las composiciones, así como para preparar los compuestos intermedios  
45 que conducen a las composiciones. Por ejemplo, se desvelan microorganismos eucariotas que pueden producir lípidos y antioxidantes deseados así como métodos para aislar y purificar los lípidos y antioxidantes deseados. Hay una variedad de métodos que se pueden usar para la preparación de estas composiciones, tales como los métodos de síntesis química y los métodos convencionales de biología molecular. Se entiende que los métodos de preparación de estas y las otras composiciones desveladas se desvelan de forma específica.

[0282] Se desvelan células producidas con el proceso de transformación de la célula con cualquier ácido nucleico. Se desvelan células producidas con el proceso de transformación de la célula con cualquiera de los ácidos nucleicos de origen no natural desvelados.

[0283] Se desvela cualquiera de los lípidos producidos con los microorganismos eucarióticos desvelados. Se desvela cualquier péptido producido con el proceso de expresión del péptido en los organismos desvelados. Métodos de uso de las composiciones.

## 4. Métodos de uso de las composiciones como herramientas de investigación

[0284] Las composiciones desveladas se pueden usar de una diversidad de formas como herramientas de  
60 investigación y para la producción de, por ejemplo, lípidos y antioxidantes.

[0285] Las composiciones desveladas se pueden usar como se discute en el presente documento ya sea como  
65 reactivos en micromatrices o como reactivos para sondear o analizar micromatrices existentes. Las composiciones

desveladas se pueden usar en cualquier método para aislar o identificar polimorfismos de un solo nucleótido. Las composiciones desveladas también se pueden usar en cualquier método para determinar el análisis alélico de, por ejemplo, las cepas de los organismos desvelados en el presente documento, en particular análisis alélico ya que se refiere a la producción de lípidos y antioxidantes. Las composiciones también se pueden usar en cualquier método conocido de ensayos de identificación sistemática, relacionados con chip/micromatrices. Las composiciones desveladas también se pueden usar en cualquier forma conocida de uso de las realizaciones de lectura informática de las composiciones desveladas, por ejemplo, para relación con el estudio o para realizar análisis de modelado molecular relacionado con las composiciones desveladas.

## 10 5. Métodos de modificación genética e interrupción genética

[0286] Las composiciones y métodos desvelados se pueden usar para interrupción y modificación genética dirigida en cualquier animal que puede experimentar estos sucesos. La modificación genética y la interrupción genética se refieren a los métodos, técnicas y composiciones que rodean a la retirada o alteración selectiva de un gen o estiramiento de cromosoma en un organismo, tal como los eucariotas desvelados en el presente documento, de una forma que propaga la modificación a través de la replicación del organismo. En general, por ejemplo, una célula se transforma con un vector que se diseña para que se recombine de forma homóloga con una región de un cromosoma o ácido nucleico en particular contenido dentro de la célula, como se describe por ejemplo en el presente documento. Este suceso de recombinación homóloga puede producir un cromosoma que tiene ADN exógeno introducido, por ejemplo en marco, con el ADN circundante. Este tipo de protocolo permite mutaciones muy específicas, tales como mutaciones puntuales, a introducir en el genoma contenido dentro de la célula. Algunos métodos para realizar este tipo de recombinación homóloga se desvelan en el presente documento.

### V. REALIZACIONES ESPECÍFICAS

25

[0287] Se desvelan métodos para preparar una composición lipídica, métodos que comprenden: cultivar un microbio productor de aceite en un medio heterótrofo que comprende un antagonista de producción de ácido graso.

[0288] También se desvelan métodos para preparar una composición lipídica, métodos que comprenden: cultivar un microbio productor de aceite en un medio heterótrofo que comprende un antagonista de producción de ácido graso, que comprende adicionalmente el aislamiento de la composición lipídica.

[0289] También se desvelan métodos para preparar una composición lipídica, métodos que comprenden: cultivar un microbio productor de aceite en un medio heterótrofo que comprende un antagonista de producción de ácido graso, en los que la proporción de ácidos grasos omega-3 y omega-6 con respecto a ácidos grasos omega-9 aumenta.

[0290] También se desvelan métodos para preparar una composición lipídica, métodos que comprenden: cultivar un microbio productor de aceite en un medio heterótrofo que comprende un antagonista de producción de ácido graso, en los que la proporción de ácidos grasos omega-3 y omega-6 con respecto a ácidos grasos omega-9 aumenta, en los que el contenido total de ácido graso está inalterado.

[0291] El microbio productor de aceite para los métodos que se describen en el presente documento puede ser una diatomea, una microalga, un hongo, una bacteria, un protista. Por ejemplo, el microbio productor de aceite tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene una identidad de al menos un 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o un 100 % identidad con la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1 o el microbio productor de aceite tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene identidad de al menos un 80 % con la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1.

[0292] El microbio productor de aceite puede ser del filo Labyrinthulomycota, de la clase Labyrinthulomycetes, de la subclase *Thraustochytridae*, del orden *Thraustochytriales*, de la familia *Thraustochytriaceae*, o del género *Thraustochytrium*.

[0293] También se desvelan antagonistas de producción de ácido graso que se pueden usar en los métodos desvelados. Los antagonistas de producción de ácido graso se pueden seleccionar entre el grupo que consiste en ácido oleico, cerulenina, ácido toluico, curcumina, ciclopropeno, galato de alquilo, galato de propilo, aceite de sésamo, aceite de cacahuete, aceite de colza, piridazinona, norflurazón, difenilamina, setoxidim, y capsaicina.

[0294] También se desvelan dispositivos de suministro que comprenden las composiciones desveladas. Los dispositivos de suministro pueden comprender una microcápsula, una microesfera, una nanoesfera o nanopartícula, un liposoma, un noisoma, un nanoeritosoma, una nanopartícula de sólido-líquido, un leuprolide, un gel, una cápsula de gel, un comprimido, una loción, una crema, una pulverización, una emulsión o un polvo.

[0295] También se desvelan métodos para preparar una composición de carotenoide, método que comprende: cultivar un microbio productor de aceite en un medio heterótrofo que comprende un antagonista de producción de ácido graso.

- [0296]** También se desvelan métodos para preparar una composición de carotenoide, método que comprende: cultivar un microbio productor de aceite en un medio heterótrofo que comprende un antagonista de producción de ácido graso, que comprende adicionalmente el aislamiento de la composición de carotenoide.
- 5
- [0297]** También se desvelan métodos para preparar una composición antioxidante, método que comprende: cultivar un microbio productor de aceite en un medio heterótrofo que comprende un antagonista de producción de ácido graso.
- 10 **[0298]** También se desvelan métodos para preparar una composición antioxidante, método que comprende: cultivar un microbio productor de aceite en un medio heterótrofo que comprende un antagonista de producción de ácido graso, que comprende adicionalmente el aislamiento de la composición antioxidante.
- 15 **[0299]** También se desvelan microcápsulas, que comprenden una aglomeración de microcápsulas y una sustancia de carga, teniendo cada microcápsula primaria individual una cubierta primaria, en las que la sustancia de carga comprende cualquiera de las composiciones descritas anteriormente, y está encapsulado por la cubierta primaria, y en las que la aglomeración está encapsulado con una cubierta externa. La cubierta primaria y/o cubierta externa pueden comprender un tensioactivo, gelatina, polifosfato, polisacárido, o una mezcla de los mismos. La cubierta primaria y/o cubierta externa también pueden comprender gelatina de tipo B, polifosfato, goma arábica, alginato,
- 20 quitosano, carragenano, pectina, almidón, almidón modificado, alfa-lactoalbúmina, beta-lactoglobulina, ovoalbúmina, polisorbitón, maltodextrina, ciclodextrina, celulosa, metil celulosa, etil celulosa, hidropropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa, proteína de leche, proteína de suero, proteína de soja, proteína de colza, albúmina, gelatina kosher, gelatina no kosher, gelatina Halal, gelatina no Halal, o una mezcla de los mismos. La cubierta primaria y/o cubierta externa también puede comprender coacervado complejo, gelatina de tipo A, gelatina de pescado, una
- 25 gelatina con un índice de Bloom de aproximadamente 0 a aproximadamente 300, una gelatina con un índice de Bloom de aproximadamente 0 a aproximadamente 50, una gelatina con un índice de Bloom de aproximadamente 51 a aproximadamente 300, una gelatina con un índice de Bloom de aproximadamente 0, aproximadamente 210, aproximadamente 220, o aproximadamente 240, un coacervado de gelatina y polifosfato.
- 30 **[0300]** La sustancia de carga de las microcápsulas desveladas de comprender aceite de cualquiera de los microbios que producen aceite desvelados, o una mezcla de los mismos. La sustancia de carga puede tener de aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 90 % o de un 50 % a aproximadamente un 70 % en peso de la microcápsula.
- 35 **[0301]** La cubierta externa de las microcápsulas desveladas puede tener un diámetro medio de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 2.000  $\mu\text{m}$ , de aproximadamente 20  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 1.000  $\mu\text{m}$ , de aproximadamente 30  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 80  $\mu\text{m}$ , de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , o de aproximadamente 0.1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ .
- 40 **[0302]** También se desvela un suplemento nutricional que comprende cualquiera de las composiciones, dispositivos de suministro, o microcápsulas descritas anteriormente. Los suplementos nutricionales desvelados pueden estar en forma de un comprimido, cápsula de gel, capsular, líquido o jarabe.
- 45 **[0303]** También se desvelan productos alimenticios que comprenden cualquiera de las composiciones, dispositivos de suministro o microcápsulas descritos anteriormente. El producto alimenticio puede ser una mercancía cocinada, una pasta, un producto cárnico, un producto lácteo congelado, un producto de leche, un producto de queso, un producto de huevo, un condimento, una mezcla para sopa, un alimento de aperitivo, un producto de frutos secos, un producto de proteína vegetal, un caramelo duro, un caramelo blando, un producto de aves de corral, un zumo de frutas procesado, un azúcar granulado, una salsa, una salsa espesa, un jarabe, una barra nutricional, una bebida, un
- 50 polvo seco para bebida, una mermelada o confitura, una fórmula infantil, o un alimento para bebés. El producto alimenticio también puede ser un producto de pescado, un alimento para animal de compañía, un alimento para el ganado o para acuicultura.
- [0304]** El producto alimenticio también puede ser pan, tortillas, cereales, salchichas, pollo, helado, yogur, leche, aderezos para ensalada, salvado de arroz, zumo de fruta, un polvo seco para bebida, bollos, galletas, galletas saladas, tartas de frutas, o bizcochos.
- 55 **[0305]** También se desvelan métodos para administrar una composición a un sujeto, que comprende administrar al sujeto cualquiera de las composiciones, dispositivos de suministro, microcápsulas, o productos alimenticios descritos anteriormente. Sujeto puede ser un mamífero. El sujeto también puede ser un ser humano.
- 60 **[0306]** También se desvela un uso de cualquiera de las microcápsulas descritas anteriormente y para preparar un medicamento para administración de una sustancia de carga a un sujeto.
- 65 **[0307]** También se desvela un método para reducir los niveles de colesterol, niveles de triglicéridos, o una

combinación de los mismos en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de las composiciones, dispositivos de suministro, microcápsulas, suplementos nutricionales o productos alimenticios descritos anteriormente.

- 5 **[0308]** También se desvela un método para suplemento de elementos traza esenciales en un sujeto, método que comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de las composiciones, dispositivos de suministro, microcápsulas, suplementos nutricionales o productos alimenticios descritos anteriormente, en el que la composición, dispositivo de suministro, microcápsula, suplemento, y producto alimenticio comprende un elemento traza esencial.
- 10 **[0309]** También se desvela un método para aumentar la sensibilidad a la insulina en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de las composiciones, dispositivos de suministro, microcápsulas, suplementos nutricionales o productos alimenticios descritos anteriormente.
- 15 **[0310]** También se desvela un método para reducir la hiperglucemia en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de las composiciones, dispositivos de suministro, microcápsulas, suplementos nutricionales o productos alimenticios descritos anteriormente.
- [0311]** También se desvela un método para reducir la hipercolesterolemia en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de las composiciones, dispositivos de suministro, microcápsulas, suplementos nutricionales o productos alimenticios descritos anteriormente.
- 20 **[0312]** También se desvela un método para reducir la grasa corporal en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de las composiciones, dispositivos de suministro, microcápsulas, suplementos nutricionales o productos alimenticios descritos anteriormente.
- 25 **[0313]** También se desvela un método para estimular la pérdida de peso en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de las composiciones, dispositivos de suministro, microcápsulas, suplementos nutricionales o productos alimenticios descritos anteriormente.
- 30 **[0314]** También se desvela un método para tratar o prevenir la diabetes en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de las composiciones, dispositivos de suministro, microcápsulas, suplementos nutricionales o productos alimenticios descritos anteriormente.
- 35 **[0315]** También se desvela una formulación farmacéutica que comprende cualquiera de las composiciones, dispositivos de suministro o microcápsulas descritos anteriormente, y un vehículo farmacéutico.

## VI. Ejemplos

- 40 **[0316]** Los siguientes ejemplos comparativos y ejemplo de trabajo 14(c) se exponen para proporcionar a los expertos habituales en la materia una divulgación y excepción completas de cómo se preparan y evalúan los compuestos, composiciones, artículos, dispositivos y/o métodos reivindicados en el presente documento, y pretenden ser puramente a modo de ejemplo. Se han realizado esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a las cifras (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero se deberían tener en cuenta algunos errores y
- 45 desviaciones. A menos que se indique de otro modo, las partes son partes en peso, la temperatura está en °C o es la temperatura ambiente, y la presión es la presión atmosférica o casi atmosférica.

### 1. Ejemplo 1 Aislamiento de la cepa ONC-T18 de *Thraustochytrium* sp.

- 50 **[0317]** Se usaron técnicas clásicas de purificación de cepa bacteriológica para aislar ONC-T18 de hojas de mangle recogidas en Advocate Harbor, Nueva Escocia. ONC-T18 se cultivó en serie a 25 °C en un medio nutriente de agar que contenía 5 g l<sup>-1</sup> de glucosa, 2 g l<sup>-1</sup> de peptona, 2 g l<sup>-1</sup> de extracto de levadura y 15,0 g l<sup>-1</sup> de agar hasta 1 l de 0,2 µm agua de mar filtrada hasta se aseguró que la pureza. Posteriormente, se preparó un medio líquido que contenía un 15 % de agua de mar artificial (marina trófica), complementado con una fuente de nitrógeno y carbono,
- 55 con 60 g l<sup>-1</sup> de glucosa y 10 g l<sup>-1</sup> de extracto de levadura, respectivamente. Este medio (50 ml de medio en matraces de 250 ml) se incubó con ONC-T18, a continuación se incubó a 25 °C y se aireó con agitación a 120 rpm.

- [0318]** La cepa ONC-T18 se separó del medio a partir de centrifugación, con biomasa celular y a continuación se lavó, se volvió a centrifugar y se liofilizó hasta finalización. A continuación, la biomasa celular se pesó para
- 60 determinar las eficacias del cultivo con los valores de biomasa por litro de medio registrados. La extracción de la fracción lipídica de biomasa y posterior separación del éster de metilo del ácido graso se realizó usando el método de Bligh y Dyer. La transesterificación se realizó mediante transferencia de material celular liofilizado a un tubo de ensayo de 10 ml con la parte superior de rosca y añadiendo HCl metanólico al 10 % y diclorometano al tubo, dejando que la mezcla reaccionará durante 2 horas a 90 °C. Los ésteres de metilo del ácido graso se extrajeron a
- 65 continuación mediante la adición de hexano:cloroformo, y el componente de éster de metilo se midió a través de

cromatografía de gases (FID) para determinar el perfil de ácido graso en cada microorganismo y la comunidad simbiótica (ONC-T18). Las concentraciones de cada éster de metilo del ácido graso (C14:0 a C22:6) se determinaron por comparación de las áreas máximas de GC de dos patrones internos (C19:0 y C23:0) añadidos en cantidades definidas tanto al comienzo (C23:0) como al final (C19:0) del proceso de transesterificación. La cantidad total de ácidos grasos por gramo de biomasa celular seca y el porcentaje del contenido de cada ácido graso, se calculó usando este método, y se muestran en la figura 2.

**[0319]** A partir del análisis de estos resultados, en conjunto con los que se muestran en la Figura 1, se puede observar que ONC-T18 demostraba la capacidad para producir cantidades crecientes de DHA, así como cantidades notables de EPA y DPA. ONC-T18, produce aproximadamente un 25 % de DHA, un 8,0 % de DPA (n-6) y un 1,0 % de EPA dentro de este medio de fermentación no optimizado. Posteriormente, se eligió ONC-T18 sobre la base de la combinación de características económicamente deseables: (1) capaz de crecimiento heterótrofo máximo (en comparación con las cepas de control); (2) contiene un porcentaje elevado de ácidos grasos omega-3 altamente insaturados; (3) capaz de crecimiento en nutrientes baratos; (4) termotolerancia, y son (5) eurihalinos.

**[0320]** Además, se compararon múltiples cepas de microbios diferentes que producen aceite con respecto a ONC-T18. Se cree que cada uno de estos microbios comprende un Traustoquítrido, y produce aceite en las cantidades mostradas en la Tabla 3.

20

Tabla 3, [ ] = mg/g

	[ ] DHA	[ ] EPA	Total Lípido	Peso (g)
<b>MYA-1381</b>	127,96	5,52	216,37	1,80
<b>ATCC-20891</b>	37,97	7,14	67,34	1,30
<b>ONC-T01</b>	5,18	7,76	50,82	0,40
<b>ONC-T02</b>	31,84	4,20	52,88	0,50
<b>ONC-T03</b>	24,87	6,97	75,00	0,60
<b>ONC-T04</b>	14,39	4,49	41,74	0,90
<b>ONC-T05</b>	11,37	3,97	34,89	0,10
<b>ONC-T06</b>	27,80	6,71	63,87	0,10
<b>ONC-T07</b>	33,02	5,49	61,81	0,50
<b>ONC-T08</b>	24,48	4,83	53,35	0,80
<b>ONC-T09</b>	63,82	4,25	109,12	0,80
<b>ONC-T10</b>	22,22	4,93	40,99	0,10
<b>ONC-T11</b>	18,37	21,25	214,98	0,80
<b>ONC-T12</b>	57,96	9,03	96,26	0,60
<b>ONC-T13</b>	12,90	4,57	39,52	1,30
<b>ONC-T14</b>	15,99	5,16	36,46	0,50
<b>ONC-T15</b>	15,53	5,11	37,72	0,50
<b>ONC-T16</b>	18,02	5,55	42,12	0,50
<b>ONC-T17</b>	36,43	4,34	94,26	0,30
<b>ONC-T18</b>	83,63	2,76	321,14	2,30
<b>ONC-T19</b>	34,71	8,07	66,14	0,60
<b>ONC-T20</b>	19,28	6,94	66,74	0,10
<b>ONC-T21</b>				
<b>ONC-T22</b>	22,72	3,26	47,58	0,60
<b>ONC-T23</b>				
<b>ONC-T24</b>	11,73	3,56	33,56	0,70
<b>ONC-T25</b>	26,99	6,11	45,67	0,60
<b>ONC-T26</b>	14,50	6,43	39,22	0,60
<b>ONC-T27</b>	26,83	7,75	61,87	0,70
<b>ONC-T28</b>	16,62	6,02	38,28	0,90

ES 2 572 833 T3

	[ ] DHA	[ ] EPA	Total Lípido	Peso (g)
<b>ONC-T29</b>	14,67	4,91	34,48	0,80
<b>ONC-T30</b>	16,56	5,42	81,88	0,80
<b>ONC-T31</b>	13,36	5,74	44,86	0,30
<b>ONC-T32</b>	19,12	6,56	53,29	0,20
<b>ONC-T33</b>				
<b>ONC-T34</b>	18,92	5,98	53,36	0,66
<b>ONC-T35</b>				
<b>ONC-T36</b>				
<b>ONC-T37</b>	35,69	11,06	82,73	0,10
<b>ONC-T38</b>	22,73	10,94	51,56	0,10
<b>ONC-T39</b>				
<b>ONC-T40</b>	26,87	8,83	67,87	0,80
<b>ONC-T41</b>	22,85	6,65	52,63	0,50
<b>ONC-T42</b>	33,65	9,22	83,93	0,80
<b>ONC-T43</b>	12,49	3,25	37,93	0,80
<b>ONC-T44</b>	11,71	2,93	55,05	1,10
<b>ONC-T45</b>	26,08	7,95	70,45	0,70
<b>ONC-T46</b>	33,34	6,27	63,76	0,30
<b>ONC-T47</b>	10,01	4,77	68,02	0,70
<b>ONC-T48</b>	26,23	3,95	69,06	0,60
<b>ONC-T49</b>	16,64	4,89	39,76	0,30
<b>ONC-T50</b>	13,64	4,56	40,30	1,00
<b>ONC-T51</b>				
<b>ONC-T52</b>	26,57	4,55	41,36	0,60
<b>ONC-T53</b>	11,40	3,56	29,20	0,70
<b>ONC-T54</b>	10,34	3,18	29,31	0,70
<b>ONC-T55</b>				
<b>ONC-T56</b>				
<b>ONC-T57</b>				
<b>ONC-T58</b>	10,30	3,13	27,10	0,70
<b>ONC-T59</b>				
<b>ONC-T60</b>	27,71	7,01	66,84	0,30
<b>ONC-T61</b>	15,72	5,62	52,56	0,40
<b>ONC-T62</b>				
<b>ONC-T63</b>	20,17	8,25	62,58	0,60
<b>ONC-T64</b>	12,16	2,97	44,73	1,10
<b>ONC-T65</b>				
<b>ONC-T66</b>				
<b>ONC-T67</b>	23,71	5,63	43,24	0,50
<b>ONC-T68</b>	22,72	6,10	41,37	0,50

**[0321]** Se entiende que así como para ONC-T18, como se describe en el presente documento, se desvela un conjunto de microbios que producen aceite como se representa mediante las capacidades de producción de aceite desveladas en el presente documento, tal como mediante un porcentaje de DHA con respecto a la producción total de aceite, o mediante la producción total de DHA, por ejemplo.

**2. Ejemplo 2 Identificación de especies de *Thraustochytrium* eucariotas de ONC-T18 usando técnicas genéticas**

- 5 **[0322]** Usando técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y cebadores que se dirigen al gen del ARN ribosómico de 18S, que son universales para todas las especies eucariotas, fue posible generar productos de PCR de los genes estructurales del microbio productor de aceite aislado a partir de ONC-T18 (como en el ejemplo 1). Los productos de PCR se secuenciaron y se denominaron SEQ ID NO: 1 para las especies eucariotas (véase la figura 2).
- 10 **[0323]** La comparación de la SEQ ID NO: 1 con las secuencias de ácidos nucleicos encontradas en la base de datos genómica, GenBank (Centro Nacional de Información Biotecnológica, Instituto Nacional de la Salud, Bethesda, MD, USA) usando el algoritmo BLAST (Herramienta de Búsqueda Básica de Alineamiento Local) identificado en la SEQ ID NO: 1 como la más relacionada con *Thraustochytrium striatum* [AF265338] (similitud de un 97,5 %).
- 15 **[0324]** Los resultados de BLAST para ONC-T18 de *Thraustochytrium* sp. se muestran a continuación.

Secuencias que producen alineamientos significativos:	Puntuación	Valor de E
gi 14279326 gb AF265338.1  <i>Thraustochytrium striatum</i> small subun...	2126	0,0
gi 50508012 dbj AB183657.1  <i>Thraustochytriidae</i> sp. MBIC11072 gen...	2121	0,0
gi 54778780 gb AY773276.1  <i>Thraustochytriidae</i> sp. FJN-10 18S rib...	1857	0,0
gi 50508019 dbj AB183664.1  <i>Thraustochytriidae</i> sp. MBIC11093 gen...	1828	0,0
gi 38524571 dbj AB1,26669.1  <i>Thraustochytrium</i> sp. CHN-1 gen for...	1748	0,0
gi 24817740 dbj AB073308.2  <i>Thraustochytriidae</i> sp. N1-27 gene fo...	1628	0,0
gi 50508018 dbj AB183663.1  <i>Thraustochytriidae</i> sp. MBIC11092 gen...	1257	0,0
gi 50508017 dbj AB183662.1  <i>Thraustochytriidae</i> sp. MBIC11091 gen...	1257	0,0
gi 50508015 dbj AB183660.1  <i>Thraustochytriidae</i> sp. MBIC11084 gen...	1255	0,0
gi 50508011 dbj AB183656.1  <i>Thraustochytriidae</i> sp. MBIC11070 gen...	1255	0,0
gi 50508016 dbj AB183661.1  <i>Thraustochytriidae</i> sp. MBIC11086 gen...	1249	0,0
gi 15823623 dbj AB052555.1  <i>Schizochytrium</i> sp. KH105 gene for 18...	1245	0,0
gi 50508013 dbj AB183658.1  <i>Thraustochytriidae</i> sp. MBIC11075 gen...	1227	0,0
gi 50508010 dbj AB183655.1  <i>Thraustochytriidae</i> sp. MBIC11067 gen...	1213	0,0
gi 54303872 gb AY758384.1  <i>Schizochytrium</i> sp. FJU-512 18S riboso...	1158	0,0
gi 14279326 gb AF265338.1 AF265338 <i>Thraustochytrium striatum</i>	1106	0,0
gi 6492308 gb AF155209.1 AF155209 <i>Labyrinthulid</i> quahog parasite ...	765	0,0
gi 16209570 gb AY052644.1  <i>Labyrinthulid</i> quahog parasite QPX sma...	757	0,0
gi 9755031 gb AF261664.1 AF261664 <i>Labyrinthulid</i> quahog parasite ...	757	0,0
gi 58176547 gb AY870336.1  <i>Thraustochytriidae</i> sp. Fngl 18S ribos...	735	0,0
gi 67624914 dbj AB191425.1  Uncultured eukaryote gene for small ...	724	0,0
gi 5509891 dbj AB022112.1  <i>Thraustochytrium striatum</i> gene for 18...	724	0,0
gi 561884 gb L34454.1 ULKRRE <i>Ulkenia profunda</i> 18S ribosomal RNA	702	0,0
gi 50508014 dbj AB183659.1  <i>Thraustochytriidae</i> sp. MBIC11077 gen...	686	0,0
gi 50508008 dbj AB183653.1  <i>Thraustochytriidae</i> sp. MBIC1060 gen...	686	0,0
gi 50508009 dbj AB183654.1  <i>Thraustochytriidae</i> sp. MBIC11063 gen...	658	0,0
gi 41391986 emb AJ535188.1  <i>Pleurosira</i> cf. <i>laevis</i> 18S rRNA gene,...	634	e-178
gi 28316562 gb AF525670.1  <i>Pleurosira laevis</i> small subunit ribos...	634	e-178
gi 5509889 dbj AB022110.1  <i>Thraustochytrium aureum</i> gene for 18S ...	634	e-178
gi 561883 gb L34668.1 TUKRRE <i>Thraustochytrium kinnei</i> 18S	628	e-176
gi 5509894 dbj AB022115.1  <i>Ulkenia radiata</i> gene for 18S rRNA	624	e-175
gi 5509893 dbj AB022114.1  <i>Ulkenia profunda</i> gene for 18S rRNA	624	e-175
gi 5509895 dbj AB022116.1  <i>Ulkenia visurgensis</i> gene for 18S rRNA	603	e-169
gi 9027563 gb AF257315.2  <i>Thraustochytriidae</i> sp. BS2 1,85 ribosom...	589	e-164

## ES 2 572 833 T3

Secuencias que producen alineamientos significativos:	Puntuación	Valor de E
gi 5509886 dbj AB022107.1  Schizochytrium limacinum gene for 18S...	581	e-162
gi 48727879 gb AY620254.1  Metromonas simplex clone TC-S small s...	571	e-159
gi 33309650 gb AF411282.1  Unidentified cercozoan 18S ribosomal ...	569	e-158
gi 28076844 gb AF530543.1  Uncultured eukaryote clone AT4-68 18S...	531	e-147
gi 30144485 gb AY256273.1  Uncultured eukaryote isolate E170 sma...	517	e-143
gi 30144529 gb AY256317.1  Uncultured eukaryote isolate D107 sma...	507	e-140
gi 14579477 gb AF363207.1  Eukaryote marine clone ME1-24 18S rib...	505	e-139
gi 39578677 gb AY426906.1  Uncultured marine eukaryote clone BL0...	504	e-139
gi 39981869 gb AY381216.1  Uncultured eukaryote clone BL010625.3...	504	e-139
gi 73533408 gb DQ103811.1  Uncultured marine eukaryote clone M4_...	504	e-139
gi 73533402 gb DQ103805.1  Uncultured marine eukaryote clone M3_...	504	e-139
gi 73533389 gb DQ103792.1  Uncultured marine eukaryote clone M2_...	504	e-139
gi 73533382 gb DQ103785.1  Uncultured marine eukaryote clone M1_...	504	e-139
gi 30144534 gb AY256322.1  Uncultured eukaryote isolate D179 sma...	504	e-139
gi 24817738 dbj AB073305.2  Thraustochytriidae sp. H1-14 gene fo...	504	e-139
gi 30268157 emb AJ519935.1 AST519935 Aplanochytrium stocchini	504	e-139
gi 58531881 gb AY882527.1  Uncultured marine eukaryote clone T41...	504	e-139
gi 463127 gb L27634.1 LADDLRRNA Labyrinthuloides minuta 16S-	504	e-139
gi 39981839 gb AY381186.1  Uncultured eukaryote clone	502	e-138
gi 39981824 gb AY381171.1  Uncultured eukaryote clone	502	e-138
gi 18026024 gb AY046848.1  Uncultured eukaryote isolate C3_E019 ...	502	e-138
gi 18026022 gb AY046846.1  Uncultured eukaryote isolate C3_E017 ...	502	e-138
gi 8026014 gb AY04683 8.1  Uncultured eukaryote isolate C3_E008 ...	502	e-138
gi 18026008 gb AY046832.1  Uncultured eukaryote isolate C3_E002 ...	502	e-138
gi 18025980 gb AY046804.1  Uncultured eukaryote isolate C2_E014...	502	e-138
gi 18025969 gb AY046793.1  Uncultured eukaryote isolate C2_E002 ...	502	e-138
gi 18025801 gb AY046625.1  Uncultured eukaryote isolate C1_E024 ...	502	e-138
gi 67624915 dbj AB191426.1  Uncultured eukaryote gene for small...	502	e-138
gi 67624913 dbj AB191424.1  Uncultured eukaryote gene for small...	502	e-138
gi 67624912 dbj AB191423.1  Uncultured eukaryote gene for small...	502	e-138
gi 39981861 gb AY381208.1  Uncultured eukaryote clone BL010320.1...	500	e-138
gi 14349249 dbj AB052556.1 Thraustochytrium sp. KK17-3 gene for...	500	e-138
gi 20218962 dbj AB073307.1  Thraustochytriidae sp. M4-103 gene f...	498	e-137
gi 59709960 gb AY916582.1  Uncultured eukaryote clone Zeuk76 18S...	496	e-136
gi 1802.5960 gb AY046784.1  Uncultured eukaryote isolate A3_E043 ...	496	e-136
gi 18025789 gb AY046613.1  Uncultured eukaryote isolate C1_E009 ...	496	e-136
gi 30144548 gb AY256336.1  Uncultured eukaryote isolate D278 sma...	496	e-136
gi 2138106 gb U59933.1 U59933 Scybaliumjamaicense 18S	496	e-136
gi 53828186 gb AY744948.1  Phytophthora palmivora isolate 88108 ...	494	e-136
gi 60687349 gb AY821976.1  Uncultured oomycete clone CV1_B2_5	494	e-136
gi 60687347 gb AY821974.1  Uncultured Phytophthora-like oomycete...	494	e-136
gi 60687342 gb AY821969.1  Uncultured oomycete clone CV1_B1_49	494	e-136
gi 39981870 gb AY381217.1  Uncultured eukaryote clone BL010625.3...	494	e-136
gi 39981864 gb AY381211.1  Uncultured eukaryote clone BL010320.2...	494	e-136
gi 39981860 gb AY381207.1  Uncultured eukaryote clone BL010320.6...	494	e-136
gi 39981844 gb AY381191.1  Uncultured eukaryote clone BL000921.1...	494	e-136

Secuencias que producen alineamientos significativos:	Puntuación	Valor de E
gi 18026046 gb AY046870.1  Uncultured eukaryote isolate C3_E044 ...	494	e-136
gi 18026039 gb AY046863.1  Uncultured eukaryote isolate C3_E035 ...	494	e-136
gi 18026031 gb AY046855.1  Uncultured eukaryote isolate C3_E026 ...	494	e-136
gi 42412527 gb AY486144.1  Pythium insidiosum 18S ribosomal RNA ...	494	e-136
gi 73533425 gb DQ103828.1  Uncultured marine eukaryote clone M2_...	494	e-136
gi 34576227 gb AY129064.1  Uncultured marine eukaryote	494	e-136
gi 30144522 gb AY256310.1  Uncultured eukaryote isolate D85 smal...	494	e-136
gi 30144521 gb AY256309.1  Uncultured eukaryote isolate D84 small...	494	e-136
gi 30144518 gb AY256306.1  Uncultured eukaryote isolate D79 smal...	494	e-136
gi 30144475 gb AY256263.1  Uncultured eukaryote isolate E106 sma...	494	e-136
gi 30144473 gb AY256261.1  Uncultured eukaryote isolate E94 smal...	494	e-136
gi 21954246 gb AY116220.1  Uncultured eukaryote clone ANT12-26 1...	494	e-136
gi 41393027 emb AJ535176.1 LMI535176 Leptocylindrus minimum 18S	494	e-136
gi 53693111 gb AY742743.1  Phytophthora tropicalis isolate 129F-...	494	e-136
gi 53693108 gb AY742759.1  Pythium vexans isolate Pyv6-2 18S rib...	494	e-B6
gi 53693105 gb AY742756.1  Pythium splendens isolate 117 18S rib...	494	e-136
gi 53693104 gb AY742755.1  Pythium aphanidermatum 18S ribosomal	494	e-136
gi 53693097 gb AY742748.1  Phytophthora capsici isolate 98110 18...	494	e-136
gi 53693096 gb AY742747.1  Phytophthora tropicalis isolate 23047...	494	e-136
gi 53693094 gb AY742745.1  Phytophthora palmivora isolate 8829 1...	494	e-136
gi 58531862 gb AY882508.1  Uncultured marine eukaryote clone T53...	494	e-136

### 3. Ejemplo 3: Producción optimizada de biomasa usando la cepa ONC-T18

[0325] La producción de aceites derivados de microbios (o de una sola célula) depende de una diversidad de variables del proceso, tales como nivel/concentración inicial del inóculo, tipo de sustrato, composición del medio, temperatura y pH. De forma específica, la producción basada en microbios de ácidos grasos altamente insaturados usando cepas de Traustoquítridos, muestra una correlación directa entre producción de biomasa y de ácido graso. En consecuencia, una comprensión de las necesidades básicas optimización de los parámetros es un factor importante para conseguir un rendimiento máximo. Por lo tanto, para determinar el mejor medio para la producción de cantidades crecientes de ácido graso, se realizaron experimentos iniciales de optimización de biomasa. De forma específica, el método de Taguchi desarrollado recientemente (Joseph J y Piganatiells JR, IIE Trans 20: 247-254, 1998), basado en matrices ortogonales, se usó para determinar la configuración óptima del medio para el aumento de la densidad óptica (relacionado directamente con la producción de biomasa). En este caso, el método de Taguchi se usó para conseguir una comprensión de los efectos acumulativos de las variables que plantean un impacto en la producción de biomasa. Los efectos de variaciones en la concentración de nitrógeno (extracto de levadura, peptona, L-glutamato), carbono (glucosa) y sal (sal marina artificial) influían en la producción de biomasa. Por lo tanto, una diversidad de medios líquidos se preparó con cantidades variables de extracto de levadura, peptona y L-glutamato (0, 4, 10, 20, 50 g l<sup>-1</sup>) ya que se refiere a cantidades variables de solución de glucosa y sal marina (5, 40, 100, 160, 200 g l<sup>-1</sup> y 0, 6, 20, 30, 40 g l<sup>-1</sup>, respectivamente). Las concentraciones se calcularon de acuerdo con una matriz ortogonal L<sup>25</sup> de una manera tal que el medio de nitrógeno de elección se diferencié a través del uso de análisis de proporción de señal con respecto a ruido (SNL) a las 48 y 120 hrs, usando la siguiente fórmula:

$$SNL = -10 \log \left[ \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{1}{y_i^2} \right]$$

25 en la que, n = número de niveles en y = rendimiento (DO<sub>600</sub> media a partir de experimentos por triplicado).

[0326] Los resultados de estos experimentos (que se dirigen de forma específica a consideraciones de biomasa), como se muestra dentro de la figura 2 que sigue a continuación, demostraron que la tasa de uso de nitrógeno con ONC-T18 que se refiere a densidad óptica (DO<sub>600</sub>) era peptona, a continuación extracto de levadura seguido de L-glutamato. Sin embargo, basándose en el crecimiento máximo, las mejores fuentes de nitrógeno para aumento de la

producción de biomasa eran extracto de levadura, a continuación peptona, seguido de L-glutamato. Además, a través del uso de experimentos similares con variaciones de glucosa y salinidad (concentración de sal marina), el medio óptimo y más barato, la composición para la producción de biomasa de ONC-T18 estaba dentro de un medio que comprendía  $2 \text{ g l}^{-1}$  de extracto de levadura,  $8 \text{ g l}^{-1}$  de MSG,  $60 \text{ g l}^{-1}$  de glucosa y  $6 \text{ g l}^{-1}$  de sal marina.

5

#### 4. Ejemplo 4: Producción optimizada de ácido docosaheptaenoico (DHA) con la cepa ONC-T18

**[0327]** Se prepararon medios que consistían en una fuente de nitrógeno (cualquiera de peptona, extracto de levadura, L-glutamato (MSG) o combinaciones de estos) y una fuente de carbono (glucosa), en una solución salina (agua de mar artificial), para determinar la composición del mejor medio para una producción óptima de biomasa y de DHA de una manera similar a la que se describe en el Ejemplo 3 (mostrado en la Tabla 4). Después de cultivo a  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $130 \text{ rpm}$  durante 3 días, biomasa, ácido graso total por litro de medio, porcentaje del contenido de ácidos grasos en peso, porcentaje del contenido de DHA en ácidos grasos totales y la cantidad de DHA por litro de medio se determinaron mediante cromatografía de gases al igual que en el método que se describe en el ejemplo 1, y en el presente documento, y como se muestra en la Tabla 4 que sigue a continuación.

**[0328]** En este caso, DHA se confirmó por comparación con patrones conocidos de DHA usando espectrometría de masas y cromatografía de gases y métodos de bloqueo máximo. Los hallazgos a partir del paquete experimental

1, en el que se investigaron variaciones en formas tanto naturales como orgánicas de nitrógeno, mostraban que la composición óptima del medio debería contener entre  $4,0$  y  $6,0 \text{ g l}^{-1}$  tanto de extracto de levadura como de L-glutamato para una producción óptima de biomasa y de DHA. Por otro lado, el paquete experimental 2, que investigaba cambios en la composición de sodio añadido al medio mostraba una producción máxima de DHA y producción de biomasa cuando se usa sal marina artificial. Además, el paquete experimental 3, en el que la concentración de sodio dentro del medio variaba, representaba el máximo para la producción de DHA y biomasa entre un 5 y un 15 % de agua marina artificial por  $\text{l}^{-1}$  de  $\text{dH}_2\text{O}$ . Los resultados a partir del paquete experimental 4, en el que se evaluaron las variaciones en los niveles de glucosa, demostraban que el intervalo de 40 a inferior a  $160 \text{ g l}^{-1}$  de glucosa se traducía en una producción óptima de biomasa y de DHA. Por último, los resultados del paquete experimental 5 indican que ONC-T18 producía valores equivalentes tanto para concentración de biomasa celular como para concentración de DHA, cuando se usaban glucosa o glicerol como fuentes de carbono.

30

Tabla 4: Resultados de experimentos de optimización de producción de DHA con respecto a variaciones en composiciones del medio.

Exp n.º	Fuentes de Carbono		Tipo de sal		Fuentes de Nitrógeno		Acidos grasos totales (g l <sup>-1</sup> )	% de ácidos grasos (% en peso)	% de contenido de DHA (% en peso)	Cantidad de DHA (g l <sup>-1</sup> )
	Fuente de carbono usada	Cantidad añadida (g l <sup>-1</sup> )	Mezcla de sal usada	Cantidad añadida (% de salinidad)	Extracto de levadura (g l <sup>-1</sup> )	MSG (g l <sup>-1</sup> )				
1	Glucosa	60,0	Sal marina	15,0	10,0	0,0	7,7	34,53	20,20	1,5579
	Glucosa	60,0	Sal marina	15,0	8,0	2,0	10,0	44,01	17,09	1,7156
	Glucosa	60,0	Sal marina	15,0	6,0	4,0	11,5	50,69	16,23	1,8624
	Glucosa	60,0	Sal marina	15,0	4,0	6,0	16,9	69,07	24,19	4,0877
	Glucosa	60,0	Sal marina	15,0	2,0	8,0	21,3	81,73	20,99	4,4752
	Glucosa	60,0	Sal marina	15,0	0,0	10,0	0,15	1,97	28,81	0,0426
2	Glucosa	60,0	Sal marina	15,0	10,0	0,0	13,2	58,92	31,44	4,1362
	Glucosa	60,0	NaCl	15,0	10,0	0,0	9,6	63,75	38,45	3,7009
	Glucosa	60,0	NaS O <sub>4</sub>	15,0	10,0	0,0	0,05	1,41	20,14	0,0109
3	Glucosa	60,0	Sal marina	5,0	10,0	0,0	14,6	59,23	31,44	4,6004
	Glucosa	60,0	Sal marina	15,0	10,0	0,0	10,8	51,01	26,17	2,8144
	Glucosa	60,0	Sal marina	37,5	10,0	0,0	15,9	69,32	25,32	4,0194
	Glucosa	60,0	Sal marina	75,0	10,0	0,0	10,8	61,02	25,25	2,7356
	Glucosa	60,0	Sal marina	100,0	10,0	0,0	11,8	68,21	24,02	2,8290
415	Glucosa	60,0	Sal marina	125,0	10,0	0,0	11,2	59,63	22,56	2,5256

(continuación)

Exp n.º	Fuentes de Carbono		Tipo de sal		Fuentes de Nitrógeno		Acidos grasos totales (g l <sup>-1</sup> )	% de ácidos grasos (% en peso)	% de contenido de DHA (% en peso)	Cantidad de DHA (g l <sup>-1</sup> )
	Fuente de carbono usada	Cantidad añadida (g l <sup>-1</sup> )	Mezcla de sal usada	Cantidad añadida (% de salinidad)	Extracto de levadura (g l <sup>-1</sup> )	MSG (g l <sup>-1</sup> )				
4	416	Glucosa	5,0	Sal marina	15,0	10,0	0,63	5,21	29,18	0,1844
	417	Glucosa	20,0	Sal marina	15,0	10,0	4,06	29,59	24,01	0,9752
	418	Glucosa	40,0	Sal marina	15,0	10,0	9,91	59,39	23,88	2,3665
	419	Glucosa	60,0	Sal marina	15,0	10,0	10,76	51,01	26,17	2,8144
	420	Glucosa	100,0	Sal marina	15,0	10,0	12,79	69,50	31,55	4,0344
	421	Glucosa	160,0	Sal marina	15,0	10,0	1,00	9,40	30,01	0,3013
5	422	Glucosa	5,0	Sal marina	15,0	10,0	0,62	12,74	29,86	0,1866
	423	Glicerol	5,0	Sal marina	15,0	10,0	0,52	18,84	35,07	0,1836

### 5. Ejemplo 5: Momento óptimo para la cosecha de ONC-T18 para producción máxima de DHA

[0329] La cepa ONC-T18 se cultivó con la misma composición del medio y condiciones en las que se muestran dentro del ejemplo 1. En este caso en particular es de interés el momento en el que se debería cosechar ONC-T18 para conseguir las cantidades máximas de DHA, DPA y EPA así como tener en cuenta el tiempo necesario para conseguir dichas cantidades (véase la figura 3).

[0330] Los resultados experimentales del transcurso del tiempo mostraban que el momento óptimo para la cosecha de ONC-T18 para producción óptima de DHA dentro del matraz y el biorreactor variaba entre 3 y 5 días, respectivamente.

### 6. Ejemplo 6: Análisis de lípidos derivados de ONC-T18

[0331] La fracción lipídica total de ONC-T18 se extrajo usando un método de Bligh y Dyer modificado. De forma específica, se volvieron a hidratar 2,0 g de biomasa celular seca durante una noche a 4 °C en 8 ml de H<sub>2</sub>O destilada. Se añadieron 30 ml de metanol:cloroformo (2:1 en vol/vol) a la mezcla y se agitó suavemente a 120 rpm durante 20 min, decantando el sobrenadante resultante. A continuación con el sedimento se volvió a suspender en metanol:cloroformo:H<sub>2</sub>O (2:1:0,8 en vol/vol/vol) y el proceso se repitió con sobrenadantes combinados y movidos a un embudo de separación. A continuación se añadieron 5 ml de cloroformo y 5 ml de H<sub>2</sub>O al embudo dando como resultado la formación de un sistema líquido de dos fases. Después de mezcla vigorosa dentro del embudo de separación, la fase de cloroformo se retiró, se concentró en atmósfera de gas N<sub>2</sub>, se volvió a suspender en cloroformo y se almacenó a -20 °C hasta su análisis. Se hizo una aplicación puntual de aproximadamente 1 µl de la fracción lipídica total en múltiples varillas de cuarzo, Chromarod, separadas y analizadas usando un instrumento latroscan MK6 TLC/FID.

[0332] El análisis de los resultados muestra que el componente de ácido graso que ONC-T18 produce en fermentaciones de heterótrofa es casi de naturaleza totalmente triglicérida (al menos un 95 %). Además de la fracción neutra de ácido graso mencionada anteriormente, el de ONC-T18 también produce una fracción de carotenoide y fosfolípido discernible. Después del aislamiento posterior de la fracción fosfolipídica, en primer lugar mediante una quemadura de un 50 % y a continuación a un 75 % seguido de separación basada en disolventes, se determinó que estaba presente una fracción fosfolipídica grande y compleja. Los resultados mostraban la presencia de componentes de fosfatidilcolina, fosfatidilserina y ácido fosfotídico dentro de la muestra.

### 7. Ejemplo 7: Producción de antioxidantes usando la cepa ONC-T18

[0333] El eucariota, ONC-T18, se cultivó usando condiciones y medio que se han mencionado anteriormente. La biomasa celular resultante después de fermentaciones heterótrofas se recoge mediante centrifugación, filtración o sedimentación. Las células se cosecharon por centrifugación a 3800 x g y se lavaron con solución salina tamponada con fosfato. La biomasa celular (fresca o liofilizada) se suspendió en 10 x de volumen de acetona, se agitó durante 5 minutos a 200 rpm, se centrifugó a la 3800 x g durante 5 minutos y se concentró a sequedad mediante evaporación de N<sub>2</sub>. A continuación, los pigmentos se volvieron a suspender inmediatamente en una cantidad mínima de acetona al 10 % en hexano y se almacenaron a -20 °C hasta el análisis de HPLC. La identificación de los extractos de carotenoide se realizó a continuación en un Agilent 1100 para HPLC (Agilent, Palo Alto, CA, USA) equipado con un conjunto de detector de longitud de onda variable a 470 nm. Las muestras se inyectaron a través de una columna de guarda Symmetry C18 (Waters, Milford, MA, USA) a una columna de fase inversa Bondclone C18 (Phenomenex, Torrance, CA, USA; partículas de 10 µm; 3,9 x 300 mm de i.d.). El volumen de dirección fue de 10 µl y se usó un flujo de 1,00 ml/min de acetona al 10 % en hexano durante un periodo de 25 minutos. Los datos cuantitativos de los carotenoides se basaban en la comparación del área máxima con patrones conocidos (en este caso astaxantina, cantaxantina, β-criptoxantina, zeaxantina, equinonona y β-caroteno; ChromaDex, Santa Ana, CA, USA). En ausencia de un patrón conocido, tal como en el caso del carotenoide, foenicoxantina, para calcular sus concentraciones se usó el área máxima de astaxantina. La identidad del carotenoide se confirmó adicionalmente por HPLC-MS usando un aparato de HPLC de Waters equipado con una matriz de fotodiodo (modelo 996 de Waters) realizada en un espectrómetro de Masas Micromass ESI-Q-ToF (Waters, Milford, MA, USA). El análisis de HPLC de ONC-T18 reveló posteriormente la presencia de varios compuestos antioxidantes (entre 50 mg kg<sup>-1</sup> y 1250 mg kg<sup>-1</sup>) dentro de la biomasa celular. Estos compuestos incluían el antioxidante, carotenoides, astaxantina, zeaxantina, cantaxantina, equineona y beta-caroteno en el intervalo de 1 mg kg<sup>-1</sup> a 20 mg kg<sup>-1</sup>, de 0,25 mg kg<sup>-1</sup> a 10 mg kg<sup>-1</sup>, de 1 mg kg<sup>-1</sup> a 20 mg kg<sup>-1</sup>, de 1 mg kg<sup>-1</sup> a 20 mg kg<sup>-1</sup> y de 1 mg kg<sup>-1</sup> a 200 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente, así como varios compuestos polifenólicos flavonoides sin identificar.

### 8. Ejemplo 8: Comparación con Microorganismos Conocidos

[0334] La capacidad de ONC-T18 para producir DHA, EPA y DPA se comparó con la de microorganismos conocidos. La cantidad de biomasa celular por litro de medio, el porcentaje del contenido de grasas o ácidos grasos por biomasa de célula seca, el porcentaje del contenido de DHA, EPA y DPA en ácidos grasos totales, y la cantidad de DHA, EPA y DPA obtenida cuando DHA, EPA y DPA se producen mediante cultivo de *Thraustochytrium aureum*

ATCC 34304, *Thraustochytrium* sp. ATCC 20891, *Thraustochytrium* sp. ATCC 20892, *Thraustochytrium roseum* ATCC 28210, *Thraustochytrium* sp. ATCC 26185, *Schizochytrium* sp. ATCC 20888, *Schizochytrium aggregatum* ATCC 28209 y *Schizochytrium limacinum* MYA-1381, así como cuando DHA, EPA y DPA se producen mediante cultivo de ONC-T18.

5

Tabla 5: Comparación de la producción lipídica y características de biomasa de varias cepas representativas de Traustocquitrinos

Microorganismo	Cantidad de biomasa celular (g l <sup>-1</sup> )	Porcentaje de contenido lipídico (% g <sup>-1</sup> )	Porcentaje de contenido de DHA (% g <sup>-1</sup> )	Porcentaje de contenido de EPA (% g <sup>-1</sup> )	Porcentaje de contenido de DPA (% g <sup>-1</sup> )	DHA Total (g l <sup>-1</sup> )	EPA Total (mg l <sup>-1</sup> )	DPA Total (mg l <sup>-1</sup> )
<i>Thraustochytrium</i> sp ATCC 20891	1,8	sin datos	12	sin datos	sin datos	sin datos	sin datos	sin datos
<i>Thraustochytrium</i> sp ATCC 20892	3	7	35	sin datos	sin datos	0,07	sin datos	sin datos
<i>Thraustochytrium</i> sp (ATCC 26185)	2,3	sin datos	41,9	3,1	10	sin datos	sin datos	sin datos
<i>T. aureum</i> ATCC 34304	4-5	8-20	24-51	3,6-9,3	sin datos	0,1-0,5	0,0001	sin datos
<i>T. roseum</i> ATCC 28210	8-17	18-25	50	sin datos	sin datos	0,6-2,1	sin datos	sin datos
<i>Schizochytrium</i> sp. ATCC 20888	10,5	50	25-37	1,2	16,8	1,95	12,3	1,68,46
<i>S. aggregatum</i> ATCC 28209	1,4	1,7	6,0	6,1	sin datos	1	1	sin datos
<i>S. limacinum</i> SR21 MYA-1381	23-40	40-53,5	29,7-34	0,2-0,4	sin datos	3,0-7,2	0,08	sin datos
ONC-T18	25-55	45-80	24-34,2	0,1-2	6-10	4,6-13	0,2-0,8	0,9-3,8

[0335] Como se muestra en la Tabla 5, es evidente que, cuando el cultivo se realiza usando ONC-T18, los valores de biomasa celular por litro de medio eran extremadamente elevados en comparación con las otras cepas sometidas a ensayo. Además, la cepa ONC-T18 tiene un porcentaje muy elevado de contenido de lípidos en comparación con las otras cepas mencionadas anteriormente. Además, el porcentaje del contenido de DHA y DPA dentro de ONC-T18 es extremadamente elevado, con niveles de EPA que se muestra que son comparables con todas las cepas identificadas sistemáticamente. Por lo tanto, parece que ONC-T18 tienen la capacidad de producir grandes cantidades de DHA, EPA y DPA en condiciones de fermentación como se menciona dentro del ejemplo 1.

### 9. Ejemplo 9: Información de la fuente de carbono alternativa

[0336] Se ha mostrado que ONC-T18 crece preferentemente en medios en los que las fuentes principales de nitrógeno son extracto de levadura, glutamato sódico y/o peptona y la fuente principal de carbono es D-glucosa. Como resultado de la formación detallada de perfiles metabólicos de ONC-T18 se observó que el glicerol (fuente de carbono) también era una alternativa viable. Además, las corrientes residuales de procesamiento de aceite de pescado que contienen glicerol también se sometió un ensayo para aplicabilidad como alternativas de nutrientes de bajo coste. Se realizaron experimentos usando 200 ml de medios en matraces de 500 ml, cultivados a 25 °C durante 3 días, 120 rpm en el caso del glicerol. El contenido de glicerol de dos productos residuales de procesamiento de aceite de pescado, GWW (lavado con glicerol agua) y GAW (lavado con glicerol ácido), constituían un 40 % en vol:vol del medio de 200 ml (ajustado a pH 6,5), aunque se añadió glicerol al 6 % a un medio de 200 ml (p:vol) como control.

[0337] El análisis de estos resultados ha determinado que el uso de componentes de corriente residual de aceite de pescado, tales como productos secundarios de glicerol, como fuentes de carbono en fermentación de ONC-T18 a gran escala a la vez que da resultado una cantidad reducida de ácido graso total, representa un contenido de DHA mantenido dentro de las células microbianas (figura 10).

35

Tabla 6: Contenido de ácido graso, biomasa y glicerol para estudio de fuente de carbono alternativa

	Porcentaje (%) de contenido de ácido graso con respecto a lípido total en peso					TFA (mg g <sup>-1</sup> )	Glicerol (g l <sup>-1</sup> )	Biomasa (g l <sup>-1</sup> )
	AA	EPA	DHA	DPA n-3	DPA n-6			
Glicerol al 6 % (p:vol)	0,29	0,52	26,31	0,24	9,49	426,12	76,00	9,13
GAW al 40 % (vol:vol)	0,37	1,32	19,69	0,42	6,36	294,55	68,59	5,94
GWW al 40 % (vol:vol)	0,46	5,55	12,46	1,01	3,82	274,33	2,70	3,08

### 10. Ejemplo 10: Multiplicador de peso de célula seca

- 5 **[0338]** La cepa ONC-T18 de *Thraustochytrium* sp. se puede cultivar para la producción de aceites omega-3 en una diversidad de configuraciones de reactor hasta 100.000 l. Todas las fragmentaciones comienzan con la preparación de un inóculo con un volumen final de un 10-20 %, que se usa para establecer el cultivo de fermentación. Las configuraciones iniciales del medio comprenden hasta 6 g/l de sal marina, 10 g/l de fuente de nitrógeno y 60 g/l de fuente de carbono, con adición semicontinua de otros 75 g/l de fuente de carbono después de 24 a 36 horas de fermentación inicial durante un periodo adicional de 72 a 96 horas y se produce dentro del intervalo de temperaturas de 18-25 °C. Por ejemplo, usando el medio de 6 g/l de sal marina, 2 g/l de extracto de levadura, 8 g/l de L-glutamato y 60 g/l de D-glucosa (con una adición de 75 g/l añadidos después de 36 horas), creciendo a 25 °C durante 96 horas, la cepa ONC-T18 fue capaz de producir 40 g/l de peso celular seco (dcw), un 80 % (dcw) de fracción total de ácido graso (TFA)/lipídica (entre C14:0 y C24:0) y un 30 % (TFA) de DHA. De forma análoga, es posible aumentar el peso celular seco multiplicando los componentes de los medios, tanto de nitrógeno como de carbono, hasta un efecto de multiplicación de biomasa similar exacto sin influir en los contenidos TFA ni de DHA. Por ejemplo, usando el medio de 24 g/l de sal marina, 8 g/l de extracto de levadura, 32 g/l de L-glutamato y 300 g/l de D-glucosa, creciendo 25 °C durante 312 horas, la cepa ONC-T18 fue capaz de producir 80 g/l de peso celular seco (dcw), 60 % (dew) de fracción total de ácido graso total (TFA)/lipídica (entre C14:0 y C24:0) y un 38 % (TFA) de DHA.

### 11. Ejemplo 11: Crecimiento de la cepa ONC-T18 de *Thraustochytrium* sp. en diversas fuentes alternativas, de carbono (C) y de nitrógeno (N), y el efecto en el peso celular seco y lípidos

- 25 **[0339]** El crecimiento de la cepa ONC-T18 de *Thraustochytrium* sp. en una diversidad de fuentes de nitrógeno y de carbono de bajo coste se investigó. De forma específica, se cultivaron, 50 ml de ONC-T18 en matraces de 250 ml que contenían 6 g/l de sales marinas artificiales, durante 72 horas a 25 °C. Las concentraciones de la fuente de carbono y nitrógeno se muestran a continuación con 2 g/l de cada fuente de nitrógeno enumerada, usada en conjunto con 8 g/l de L-glutamato (con la excepción de harina de pescado cuando se usaban 4 g). Las fuentes de carbono se intercambiaron según se ha indicado. Todos los experimentos se realizaron por triplicado; todas las extracciones para análisis de éster de metilo de ácido graso se realizaron por triplicado junto con inyecciones de GC por triplicado.

- 35 **[0340]** Los resultados indican que ONC-T18 de *Thraustochytrium* sp. produce una cantidad óptima de biomasa celular seca (es decir, una cantidad superior a la de las dos medidas de control) cuando se cultiva en el extracto de levadura y la harina de pescado de EMD como fuentes de nitrógeno. Por el contrario, se encontró que la cantidad de lípido era inferior a la de control, aunque la cantidad de DHA era óptima usando agua de macerado de maíz y peptona de EMD. Por último, se encontró que la fuente de carbono, dextrosa, aumentaba el contenido lipídico, aunque la fructosa y la dextrosa producían un contenido más elevado de DHA que los controles.

40

Tabla 7: Crecimiento de ONC-T18 de *Thraustochytrium* sp.

Medio (6 g/l de sal, crecimiento 72 hrs, cultivos de 50 ml)		C (g/l)	N (g/l)	dew/l medio (g)	Lípido (mg/g)	Lípido (g/l)	DHA (mg/g)	DHA (g/l)	DHA (% de lípidos)
Fuentes de Nitrógeno	Agua de Macerado de Maíz-	60	10	11,36	371,97	4,33	111,64	1,244	29,72
	Semilla de Algodón-MSG	60	10	9,99	297,08	2,70	45,20	0,500	16,94
	EMD™ YE-MSG	60	10	15,49	343,90	5,02	70,68	0,786	20,70
	EMD™ YE	60	10	35,79	189,01	6,76	37,14	0,448	19,65
Fuentes de Nitrógeno	EMD™ Peptona- MSG	60	10	11,70	379,48	4,19	83,50	0,926	23,33
	Sigma™ YE-MSG	60	10	9,77	257,86	3,28	54,60	0,618	19,69
	Sigma™ YE	60	10	10,39	341,98	3,53	58,30	0,629	17,01
	Fermtech™ YE-MSG	60	10	13,99	269,53	3,82	56,97	0,664	21,10
	Fermtech™ YE	60	10	17,07	243,23	4,15	48,01	0,530	19,74
	Harina de pescado (62 % de proteína)	60	12	19,53	290,72	5,68	73,59	0,828	25,31
Fuentes de Carbono	Fructosa	60	10	14,57	498,54	8,09	96,97	1,070	21,55
	Dextrosa	60	10	14,98	623,91	9,87	113,69	1,232	18,94
	Dextrina de maíz	60	10	4,65	89,69	0,39	25,69	0,278	26,75
	Gelatina	60	10	7,09	31,87	0,13	11,86	0,127	27,70
	Almidón (maíz)	5	10	4,85	94,04	0,46	19,49	0,206	20,72
		30	10	3,13	90,07	0,28	23,78	0,256	26,40
	Almidón (trigo)	5	10	8,03	86,96	0,47	17,62	0,185	17,76
		30	10	18,16	18,59	0,34	3,83	0,042	20,58
Medio de control (1)		60	10	16,92	487,59	8,25	70,87	0,768	13,25
Medio de control (2)		60	10	10,88	483,06	6,06	74,64	0,818	16,19

Abreviaturas:

MSG = L-glutamato  
(sódico)

YE = Extracto de levadura

**12. Ejemplo 12: Técnicas de Extracción para aislamiento de lípidos totales y fracciones**

- 5 **[0341]** Se sometieron a ensayo una diversidad de métodos para el aislamiento de aceites omega-3 seleccionados para determinar la eficacia óptima del aislamiento. Estos métodos incluían: el método convencional de Bligh y Dyer (Bligh y Dyer, Can J. Biochem. Physiol., 37: 912-917, 1959); el método de extracción y transesterificación combinadas usado de forma específica con especies de *Thraustochytrium* que permite el procesamiento de muestras para análisis de GC FAME rápido (Lewis *et al.*, J. Microbiol. Methods, 43: 107-116, 2000); extracción mediante saponificación simultánea (Cartens *et al.*, J. Am. Oil Chem. Soc. 73: 1025-1031, 1996); y extracción en fase sólida usando columnas sobre gel de sílice que pueden aislar triglicéridos, diglicéridos y monoglicéridos de forma selectiva (Pinkart *et al.*, J. Microbiol. Methods, 34: 9-15, 1998; Bateman y Jenkins, J. Agric. Food Chem., 45: 132-135, 1997).

- 15 **[0342]** De forma específica, 40 gramos de peso celular seco de biomasa de la cepa ONC-T18 de *Thraustochytrium* sp. producida en una sola realización de fermentación (véase el ejemplo 1) se dividieron en lotes de 0,44 g y se usaron para cada técnica. Todas las técnicas se realizaron por triplicado con eficaces analizadas usando determinación de éster de metilo del ácido graso a través de FID-GC, de nuevo por triplicado con realizaciones por triplicado por muestra. Los resultados demuestran que el contenido total de ácido graso total podía variar entre métodos individuales con fluctuaciones lo más probablemente debidas a la saturación de disolvente: compuesto, 20 consideraciones de alteración de biomasa y otras consideraciones de condiciones físicas (por ejemplo, temperatura y tiempo).

Tabla 8: Técnicas de Extracción para aislamiento de lípidos totales y fracciones

<b>Bligh y Dyer</b>												
	DHA	EPA	C14:0	C14:1	C15:0	C16:0	C16:1	C18:1	C20:0	C20:4	C22:5	TFA
	mg de omega-3 por gramo de biomasa (mg/g)											
<b>1</b>	104,39	4,25	36,28	5,82	113,94	77,27	4,92	44,01	1,13	1,67	28,86	430,99
<b>2</b>	136,75	5,45	46,51	7,40	142,96	98,38	6,07	56,49	1,40	2,19	37,92	552,98
<b>3</b>	134,59	4,78	42,51	6,91	128,54	87,01	5,20	51,10	1,30	2,10	35,98	532,91
<b>Prom.</b>	<b>125,24</b>	<b>4,83</b>	<b>41,77</b>	<b>6,71</b>	<b>128,48</b>	<b>87,55</b>	<b>5,40</b>	<b>50,53</b>	<b>1,28</b>	<b>1,99</b>	<b>34,25</b>	<b>505,63</b>
<b>Transesterificación Directa</b>												
	DHA	EPA	C14:0	C15:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C20:0	C20:4	C22:5	TFA
	mg de omega-3 por gramo de biomasa (mg/g)											
<b>1</b>	104,39	4,24	36,39	5,42	112,94	75,27	5,42	44,01	1,13	1,67	28,86	420,99
<b>2</b>	89,83	4,54	34,81	5,60	103,04	73,43	5,56	42,85	0,98	1,87	25,35	392,88
<b>3</b>	101,64	4,25	37,16	5,98	106,94	75,98	5,35	43,95	1,11	1,78	26,46	410,65
<b>Prom.</b>	<b>98,65</b>	<b>4,34</b>	<b>36,12</b>	<b>5,67</b>	<b>107,64</b>	<b>74,89</b>	<b>5,44</b>	<b>43,60</b>	<b>1,07</b>	<b>1,77</b>	<b>26,89</b>	<b>408,17</b>
<b>Saponificación simultánea</b>												
	DHA	EPA	C14:0	C15:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C20:0	C20:4	C22:5	TFA
	mg de omega-3 por gramo de biomasa (mg/g)											
<b>1</b>	204,85	6,75	46,55	8,56	182,26	134,81	8,73	105,04	2,16	3,20	66,68	785,25
<b>2</b>	188,51	6,17	47,64	9,32	208,29	121,25	10,35	95,80	2,53	2,89	61,41	770,14
<b>3</b>	198,25	6,12	47,21	9,65	207,71	136,51	9,58	98,50	2,41	3,10	63,58	782,54
<b>Prom.</b>	<b>197,20</b>	<b>6,35</b>	<b>47,13</b>	<b>9,18</b>	<b>199,42</b>	<b>130,86</b>	<b>9,55</b>	<b>99,78</b>	<b>2,37</b>	<b>3,06</b>	<b>63,89</b>	<b>779,31</b>
<b>Extracción en fase sólida</b>												
	DHA	EPA	C14:0	C15:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C20:0	C20:4	C22:5	TFA
	mg de omega-3 por gramo de biomasa (mg/g)											
<b>1</b>	169,17	0,42	68,41	10,83	204,43	140,14	8,09	76,97	1,75	3,00	47,05	748,33
<b>2</b>	172,26	0,44	69,59	11,01	207,01	143,74	8,11	78,72	1,74	3,27	47,86	819,04
<b>3</b>	173,65	0,43	69,21	11,31	208,97	146,64	8,16	77,64	1,73	3,64	46,98	785,64
<b>Prom.</b>	<b>171,69</b>	<b>0,43</b>	<b>69,07</b>	<b>11,05</b>	<b>206,80</b>	<b>143,51</b>	<b>8,12</b>	<b>77,78</b>	<b>1,74</b>	<b>3,30</b>	<b>47,30</b>	<b>784,34</b>

N.B: Cada valor enumerado anteriormente es el promedio de las realizaciones por triplicado usando FID-GC para análisis de FAME

5 **13. Ejemplo 13: Aislamiento y caracterización de la cepa ONC-T18 de *Thraustochytrium* sp. que produce ácido graso poliinsaturado: identificación sistemática para identificar la cepa y optimización de producción en la misma.**

#### a) Materiales y Métodos

##### (1) Aislamiento y Mantenimiento de Traustoquítridos

10

[0343] Setenta muestras marinas que incluían: *Spartina alterniflora*, *Zostera marina* y sedimento se recogieron en lugares de la costa canadiense oriental de Nueva Escocia, Prince Edward Island, New Brunswick, Newfoundland y Labrador entre julio y agosto de 2002. Las muestras se colocaron en viales de 20 ml que contenían 10 ml de aguamarina natural filtrada con filtro de 0,2  $\mu\text{m}$  y 300  $\text{mg l}^{-1}$  de penicilina y 500  $\text{mg l}^{-1}$  de estreptomycin. Las suspensiones se cebaron con polen estéril (*Acer* sp.) y se incubaron durante 48 horas a 18 °C, de acuerdo con (Bremer, Marine Mycology - A Practical Approach, Fungal Diversity Press, Hong Kong, pp 49-61 (2000)). Los granos de polen se transfirieron a continuación en bucle y se sembraron en estrías en placas B1 de agar (1  $\text{g l}^{-1}$  de extracto de levadura, 1  $\text{g l}^{-1}$  de peptona, 10  $\text{g l}^{-1}$  de agar en 1 l de aguamarina natural) que contenían antibióticos y se incubaron. Las colonias hialinas, irregulares, individuales formadas por células esféricas o limaciformes y atípicas de cualquier colonia de levadura o bacterias se seleccionaron y se subcultivaron al menos tres veces en placas B1 para pureza.

15

20

**(2) Producción de biomasa para identificación sistemática de ácido graso**

**[0344]** Para identificar sistemáticamente aislados para crecimiento y producción de ácido graso, se preparó medio líquido usando aguamarina natural filtrada con filtro de 0,2 µm que contenía 2 g l<sup>-1</sup> de peptona (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) y 2 g l<sup>-1</sup> de extracto de levadura (BD, Franklin Lanes, NJ, USA), que se esterilizó en autoclave, seguido de la adición de 5 g l<sup>-1</sup> de glucosa esterilizada con filtro de 0,2 µm (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (Bowles *et al.*, J Biotechnol 70: 193-202 (1999)). Se inocularon 30 ml de volumen de cultivo en bucle desde una placa de agar y se cultivaron durante 4 días a 18 °C en un agitador a 100 RPM. A continuación, se usaron 5 ml de este cultivo para inocular un cultivo de 95 ml incubado durante un periodo adicional de 4 días (fase estacionaria). Las células se cosecharon mediante centrifugación a 4.500 RPM, se aclararon con 5 ml de agua destilada y se volvieron a centrifugar. Los sedimentos celulares se liofilizaron, se pesaron y se almacenaron a - 80 °C antes de derivatización para análisis de ácido graso.

**(3) Preparación de ésteres de metilo del ácido graso (FAME)**

**[0345]** La extracción del éster metílico de ácido graso (FAME) se realizó a través del método de transesterificación directa, modificado de Lewis *et al.* (J Microbiol Meth. 43: 107-116 (2000)). De forma específica, se añadieron 20 mg de material liofilizado y se añadieron 3 ml de mezcla de reacción de transesterificación (metanol:ácido clorhídrico:cloroformo (10:1:1 en vol/vol)). Las células se sometieron a agitación vorticial durante 10 segundos para asegurar una dispersión uniforme de la biomasa y se colocaron a 90 °C durante 120 minutos. Una vez que se la transesterificación era completa, las muestras se retiraron y se permitió que se enfriaran a temperatura ambiente. A continuación se añadió agua (1 ml) y se sometió a agitación vorticial durante 10 segundos. A continuación, se extrajeron los FAME mediante la adición de alícuotas de 3 x 2 ml de hexano:cloroformo (4:1), se sometió a agitación vorticial durante 10 segundos, y se permitió que sedimentara hasta que se consiguieran separaciones líquidas transparentes.

**(4) Análisis de cromatografía de gases (GC) de los FAME**

**[0346]** El análisis de GC de los FAME se realizó usando dos patrones internos (de 200 µl cada uno). Antes de la transesterificación se añade un ácido hexacosanoico (C23:0) y el otro, ácido nonadecanoico (C19:0) se añade directamente antes del análisis. El análisis se realizó usando un Agilent 6890 GC (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) equipado con una columna de capilaridad de sílice fundida OMEGAWAX 320 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) de diámetro interno de 30 m x 0,32 m (0,25 µm de espesor de la película) y detector de ionización a la llama (volumen de inyección de 1 µl, gas vehículo H<sub>2</sub> con un flujo constante de 5,0 ml min<sup>-1</sup> y se ajustó a 250 °C, proporción de separación de 50:1 con respecto al detector de FID a 275 °C). La confirmación de la identidad de FAME se realizó usando un espectrómetro de masas Trace GC-DSQ (Thermo Electron, Boston, MA, USA) y comparación de los tiempos de retención para patrones de laboratorio.

**(5) Identificación genética**

**[0347]** El ADN genómico se extrajo usando el Kit de Aislamiento de ADN Microbiano MoBio UltraClean (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los cebadores de oligonucleótido usados en la amplificación del gen de ARNr de 18S, se modificaron a partir de Honda *et al.* (J Eukaryot Microbiol. 46: 637-647 (1999)), es decir, 5'-CAACCTGGTTGATCCTGCCAGTA-3' para T18S1F y 5'-TCACTACGGAAACCTTGTACGAC-3' para T18S5R. Una mezcla de reacción de PCR de 20 µl contenía 2U Biolase™ ADN polimerasa (Bioline, Boston, MA, USA), 1 x tampón de reacción de NH<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, Betaína 1 M (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 200 µM de mezcla de nucleótidos para PCR (Promega, Madison, WI, USA), 1 µM de cada cebador directo e inverso (MWG Biotech., High Point, NC, USA) y 100 ng de molde de ADN genómico. Después de una etapa de desnaturalización inicial durante 3 minutos a 94 °C, la amplificación con PCR se realizó usando un ciclador térmico de gradiente de ciclo Eppendorf Master (Eppendorf, Westbury, NY, USA), usando un programa de 45 segundos a 94 °C, 30 segundos a 64 °C y 2 minutos a 72 °C durante 30 ciclos, seguido de una extensión final de 10 minutos a 72 °C. El producto de PCR se purificó usando el Kit Clean-up para PCR MoBio UltraClean (MoBio Laboratories Inc, Carlsbad, CA, USA) para secuenciación directa (MWG Biotech., High Point, NC, USA) usando los cebadores FA2, FA3, RA1, R (Mo *et al.*, Mar Biol 140: 883-889 2002), T18S1F y T18S5R. Las secuencias resultantes se alinearon y se compararon con secuencias de nucleótidos de microorganismos similares depositadas en GenBank (Benson *et al.*, Nucleic Acids Res 33: D34-38 (2005)) usando DS Gene (Accelrys, San Diego, CA, USA). Posteriormente se generó un árbol filogenético usando el método de Neighbor-Joining (Saito y Nei, Mol Biol Evol 4: 406-425 (1987)), con la significancia estadística evaluada usando 1.000 remuestreos de impulso (Felsenstein, Evolution 39: 783-791 (1985)).

**(6) Identificación de carotenoides**

**[0348]** Las células se cosecharon mediante centrifugación a 3800 x g y se lavaron con solución salina tamponada con fosfato. A continuación se volvieron a suspender 10 x de volumen de acetona (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), se agitaron durante 5 minutos a 200 RPM, se centrifugaron a 3.800 x g durante 5 mins y se concentraron a

sequedad mediante evaporación de N<sub>2</sub>. Después se volvieron a suspender en una cantidad mínima de acetona al 10 % en hexano antes del análisis de HPLC. Las identificaciones se realizaron en un Agilent 1100 HPLC (Agilent, Palo Alto, CA, USA) equipado con un detector de longitud de onda variable ajustado a 470 nm. Las muestras se inyectaron a través de una columna de guarda C<sub>18</sub> Symmetry (Waters, Milford, MA, USA) a una columna Bondclone C<sub>18</sub> de fase inversa (Phenomenex, Torrance, CA, USA; partículas de 10 µm; 3,9 x 300 mm de i.d.). El volumen de inyección fue de 10 µl y se usó un flujo de 1 ml min<sup>-1</sup> de acetona al 10 % en hexano durante un periodo de 25 minutos. La identidad del carotenoide se confirmó adicionalmente con análisis de espectrometría de masas (Micromass ESI-QToF MS, Waters, Milford, MA, USA). Los datos cuantitativos para cada carotenoide se basaban en el desarrollo de una curva de calibración usando patrones (astaxantina, zeaxantina, cantaxantina, equinenona y β-caroteno) y comparando el área máxima con concentraciones definidas.

### (7) Optimización de la fermentación

[0349] El efecto de carbono, nitrógeno y sal marina en el ácido graso y en la producción de DHA se examinó usando cultivos en lotes en matraces Erlenmeyer de 250 ml agitados a 130 RPM durante 3 días a 25 °C. Los estudios de cultivo adicionales se realizaron usando un Biorreactor de 5 l Biostat<sup>®</sup> Bplus Twin (Sartorius BBI Systems Inc., Bethlehem, PA, USA). Un inóculo de 100 ml se usó para inocular 4,9 l de medio en el biorreactor. La concentración de glucosa se midió usando el Kit de Ensayo de Glucosa (HK) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los componentes del medio y las condiciones usadas en el biorreactor se detallan con los resultados relevantes.

#### b) Resultados

[0350] Se desarrolló un proceso de recogida e identificación sistemática con el que algunos miembros de la familia protista Labyrinthulida, en especial el género, Schizochytrium y Thraustochytrium, se aislaron usando cebo de polen y medios bacteriológicos selectivos. Este estudio, que cubría 20 sitios de recogida únicos dispersados por toda la parte atlántica de Canadá, produjo 68 cepas puras, identificadas de forma microscópica. La selección de cepas oleaginosas, que tenían más de un 20 % de su peso seco celular siendo ácidos grasos, se basó en resultados de formación de perfiles de GC PUFA, productividad de biomasa, concentraciones máximas de TFA, DHA y en menor medida de EPA (Fig. 11), de acuerdo con el método de (Lewis *et al.*, J Microbiol Meth 43: 107-116 (2000)). Los valores para productividad desde biomasa, TFA y DHA y EPA posteriores variaban de 100 a 2300 mg l<sup>-1</sup>, de 27,1 a 321,14, de 5,18 a 83,63 y de 2,97 a 21,25 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente (Fig. 11).

[0351] Todos los aislados que crecían en medio líquido (54 de 68), producían cantidades importantes de ácido graso poliinsaturado omega-3, en particular DHA que comprendía entre un 22 y un 80 % del contenido total de C20 con respecto a C22 de estas células (Fig. 11). Esto confirma los hallazgos previos, con lo que los traustóquitridos aislados a partir de entornos templados frescos tienen perfiles de ácido graso con DHA siendo hasta un 53 % del ácido graso total presente (Bowles *et al.*, J Biotechnol 70: 193-202 (1999) y Huang *et al.*, Mar Biotechnol 5: 450-457 (2003)). Es de interés en particular que ONC-T18, que produce hasta un 90 % de su contenido de C20 con respecto a C22 como DHA que es aproximadamente un 35 % de los ácidos grasos intracelulares totales. Se mostró que este contenido de DHA era equivalente a los de varias cepas de producción comercial, tales como ATCC 20888 de Schizochytrium sp. (32 %) y MYA-1381/SR21 de *S. limacinum* (34 %) (Barclay *et al.*, J Appl Phycol 6: 123-129 (1994) y Yokochi *et al.*, Appl Microbiol Biotechnol 49: 72-76, (2003)). Además, todos los aislados sintetizaban ácido eicosapentaenoico (EPA), que variaba entre un 2 y un 20 % en p/p de los PUFA totales identificados (Fig. 11). Además de los aceites omega-3 producidos, aproximadamente un 80 % de todos los aislados sintetizaban los PUFA omega-6, ácido araquidónico (AA) o ácidos docosapentaenoico (DPA), a concentraciones que variaban entre un 1 y un 18 % y entre un 3 y un 7 % en p/p, respectivamente (Fig. 11).

[0352] Huang *et al.* (Mar Biotechnol 5: 450-457 (2003)) sugirieron que para los traustóquitridos aislados a partir de las aguas costeras tropicales de Japón y Fiji, se podían describir cinco perfiles de ácido graso poliinsaturado, es decir DHA/DPA (n-6), DHA/DPA/EPA, DHA/EPA, DHA/DPA/EPA/AA y DHA/DPA/EPA/AA/ácido docosatetraenoico (Huang *et al.*, Mar Biotechnol 5: 450-457 (2003)). En el caso de esta colección de traustóquitridos, aislados de las aguas templadas de la zona atlántica de Canadá, se pudieron determinar cuatro perfiles de PUFA, tres de los cuales son idénticos a los mencionados anteriormente, es decir DHA/DPA/EPA a un 7,4 % de recogida, DHA/EPA a un 13 % de recogida y DHA/DPA/EPA/AA, a un 74 %, con un cuarto que comprende una mezcla de DHA/EPA/AA a un 5,6 %.

[0353] A través de secuenciación directa del gen de ADN<sub>r</sub> de 18S, la cepa ONC-T18 se identificó de forma positiva como miembro de la familia de los Traustóquitridos (Número de Registro en GenBank: DQ374149). El análisis filogenético indicaba que ONC-T18 formaba un grupo único (identidad de un 97,5 %) con T91-6 de *Thraustochytrium striatum* (Fig. 12) (Leander y Porter, Mycologia 93: 459-464 (2001)). Aunque MBIC 11093 de *Thraustochytrium* sp., N1-27 y CHN-1 de *Thraustochytrium* sp., recogidas de las aguas tropicales costeras de Japón, y encontradas que eran productores significativos de DHA (Carmona *et al.*, Biosci Biotechnol Biochem 67:884-888 (2003) y Huang *et al.*, Mar Biotechnol 5: 450-457 (2003)), mostraron que eran similares en un 96, 195, 5 y un 94,5 %, respectivamente. La diversidad genética es bastante baja entre todos los miembros de los *Thraustochytridae* mostrados en la figura

12, variando en un 97,5-91,0 % de similitud entre ellos. Además con estas especies se destruyen de forma global, con dos tercios aislados a partir de las aguas costeras tropicales de Japón, China e Israel y el resto de las aguas templadas de América, Europa y Canadá.

5 **[0354]** El perfil de ácido graso de ONC-T18 incluía contenidos elevados de PUFA C22, niveles muy bajos de FA C18 y C20, y la aparición de ácidos grasos saturados de cadena impar (15:0 y 17:0), similares a los de KH105 de *Schizochytrium sp.* o SR21 de *S. limacinum*. Además, el análisis de los perfiles de uso de carbono y nitrógeno para las cepas ONC-T18, SR21 y KH105 mostraba un patrón de asimilación similar. El contenido de DPA n-6 en la cepa ONC-T18 variaba de un 6-10 %, que parece que es extremadamente elevado considerando la aparición limitada de DPA n-6 en la biosfera. Sin embargo, se informó de niveles de DPA n-6 similares en Nakahara *et al.* (JAm Oil Chem Soc 73: 1421-1426 (1996)) en SR21 de *Schizochytrium sp.* (6-10 %) y Ellenbogen *et al.* (Comp Biochem Physiol 29: 805-81 (1969)) en *T. aureum* (9,5 %) y *T. roseum* (6,6 %).

15 **[0355]** El análisis del perfil de ácido graso de ONC-T18 en tres configuraciones de cultivo diferentes: (1) placa de agar; (2) matraz cónico y (3) biorreactor y cultivando en el mismo medio (Fig. 13), muestra una disminución de la diversidad de los PUFA presentes y un aumento total de TFA a partir de placa de agar con respecto a biorreactor. De forma específica, las placas de agar presentaban una matriz de los PUFA, mientras que los cultivos en matraz y biorreactor estaban dominados por uno o dos compuestos intermedios (Fig. 13). En comparación con *Thraustochytrium aureum*, que decía mejor en cultivo en matraz que en un fermentador de tanque agitado (Ilda *et al.*, J Ferment Bioeng 81: 76-78 (1996)) la cepa ONC-T18 crecía mejor en un biorreactor. Esto está de acuerdo con lo que considera (Nakahara *et al.*, J Am Oil Chem Soc 73: 1421-1426 (1996)), se encuentra que SR21 de *Schizochytrium sp.* presentaba alta resistencia a la agitación mecánica, y por lo tanto se desarrollaba en condiciones de biorreactor.

25 **[0356]** Además, se encontró que algunos pigmentos carotenoides a producir en fermentaciones en placa, matraz y biorreactor de la cepa ONC-T18 de *Thraustochytrium sp.* daba como resultado una decoloración de color naranja pálido. La producción de estos antioxidantes es máxima dentro de fermentaciones en biorreactor de forma simultánea con la producción de ácido graso. Además, a través del uso de espectrometría de masas con HPLC, se determinó que estos compuestos antioxidantes se identificaban como astaxantina, zeaxantina, cantaxantina, equineona y  $\beta$ -caroteno (Fig. 14), estando conjugados con diversos PUFA. Se informó de resultados similares entre miembros del grupo de los Traustochytriales de protistas. De forma específica, se mostró que el agregado de *Schizochytrium* producía equinenona y cantaxantina (Valadon, Trans Br Mycol Soc 67: 1-15 (1976)), mientras que Carmona *et al.* (Biosci Biotechnol Biochem 67: 884-888 (2003) y Huang *et al.* (Mar Biotechnol 5: 450-457 (2003)) demostraban la producción de astaxantina, equinenona, cantaxantina, foenicoxantina (no zeaxantina como en la cepa ONC-T18) y  $\beta$ -caroteno por la cepa CHN-1 de *Thraustochytrium sp.*, un pariente cercano de la cepa ONC-T18 (Fig. 12). En este estudio, se encontró que algunas concentraciones de los carotenoides eran de un orden de magnitud inferior a los de CHN-1 con el costo principal siendo  $\beta$ -caroteno, en lugar de astaxantina. Por lo tanto, dentro de *Thraustochytrium spp.*, la producción de PUFA y carotenoide se puede unir de modo que no almacena dentro de las grasas que se están produciendo se puede proteger de la oxidación.

40 **[0357]** Anteriormente, se ha determinado que las cantidades relativas de los componentes el ácido graso principal (ácidos mirístico, palmítico y oleico) se pueden alterar en cierto modo cambiando las condiciones de crecimiento del cultivo (Ilda *et al.*, J Ferment Bioeng 81: 76-78 (1996)). De esta manera, se puede manipular la composición final del ácido graso y por lo tanto, las propiedades físicas del PUFA deseado de una manera controlada durante la fermentación (Sijtsma *et al.*, Recent Res Devel Microbiol 2: 219-232 (1998)). En un intento para limitar los factores que inhiben la producción tanto de biomasa como de PUFA omega-3 en la cepa ONC-T18, los componentes de carbono, nitrógeno y sal marina en medios de nutrientes se manipularon (Tabla 9), junto con la duración del cultivo (Fig. 15).

50 Tabla 9: Producción media de biomasa (SD < 15 %), contenido de ácido graso total (TFA) y DHA de la cepa ONC-T18 de *Thraustochytrium sp.*

Glucosa (g l <sup>-1</sup> )	Biomasa (g l <sup>-1</sup> )	TFA (% de biomasa)	DHA (% de TFA)	DHA (g l <sup>-1</sup> )
5	12,13	5,21	29,18	0,18
20	13,73	29,59	24,01	0,98
40	16,69	59,39	23,88	2,37
60	21,08	51,01	26,17	2,81
100	18,40	69,49	31,55	4,03
160	10,68	9,40	30,01	0,30

YE (g l <sup>-1</sup> )	MSG (g l <sup>-1</sup> )	Biomasa (g l <sup>-1</sup> )	TFA (% de biomasa)	DHA (% deTFA)	DHA (g l <sup>-1</sup> )
10	0	22,33	34,53	20,20	1,56
8	2	22,81	44,00	17,52	1,72
6	4	22,64	50,69	16,23	1,86
4	6	24,46	69,07	24,19	4,09
2	8	26,09	81,73	20,99	4,47
0	10	7,50	1,97	28,81	0,04

Sal marina (g l <sup>-1</sup> )	Biomasa (g l <sup>-1</sup> )	TFA (% de biomasa)	DHA (% deTFA)	DHA (g l <sup>-1</sup> )
2	24,70	59,23	31,44	4,60
6	21,08	51,01	26,17	2,81
15	22,90	69,32	25,32	4,02
30	17,76	61,02	25,25	2,74
40	17,27	68,21	24,02	2,83
50	18,77	59,63	22,56	2,53

**[0358]** Dentro de este estudio, a medida que la concentración de nitrógeno disminuía, el contenido total de ácido graso aumentaba, con el contenido total de ácido graso más elevado (aproximadamente un 80 %) obtenido a una concentración de un 1 % de extracto de levadura y/o glutamato monosódico (p/v). Sin embargo, los cultivos con una concentración de nitrógeno baja también imitaban el crecimiento celular y por lo tanto la producción total de ácido graso total. En este experimento, la producción óptima se obtuvo usando 8 g l<sup>-1</sup> de glutamato monosódico y 2 g l<sup>-1</sup> de extracto de levadura, produciendo 26,1 g l<sup>-1</sup> de biomasa y 4,5 g l<sup>-1</sup> de DHA (Tabla 9). Además, los aumentos de carbono hasta 100 g l<sup>-1</sup> aumentaban de forma eficaz el rendimiento de DHA, y esto está de acuerdo con los resultados obtenidos para la cepa SR21 de *Schizochytrium sp.* (Yokochi *et al.*, Appl Microbiol Biotechnol 49: 72-76, (2003)) y al contrario que los mostrados para *T. aureum* en los que las concentraciones de glucosa superiores a 10 g l<sup>-1</sup> eran inhibitorias (Ilda *et al.*, J Ferment Bioeng 81: 76-78 (1996)). Los rendimientos máximos de DHA de más de 4,0 g l<sup>-1</sup> se obtuvieron en medio de glucosa, con rendimientos superiores a más de 5 veces los de *T. aureum* (Bajpai *et al.*, J Am Oil Chem Soc 68: 509-514 (1991)) y *T. roseum* (Li y Ward, J Ind Microbiol 13: 238-241 (1994)) y 15 comparables con los de las cepas SR21 y KH105 de *Schizochytrium sp.* (Aki *et al.*, J Am Oil Chem Soc 80: 789-794 (2003)). Por último, la cepa ONC-T18 presentaba capacidades eurihalinas clásicas, siendo capaces de resistir salinidad es que variaban de 2,0 a 50,0 g l<sup>-1</sup>, dando como resultado una productividad de biomasa de una variabilidad de un 25-30 % (Tabla 9). En el mismo experimento, se encontró que los valores de DHA en g l<sup>-1</sup> variaban hasta un 45 % entre la cantidad óptima de 4,6 g l<sup>-1</sup> y mínima de 2,5 g l<sup>-1</sup> (Tabla 9).

**[0359]** La biomasa, TFA y DHA producidos por la cepa ONC-T18 durante un periodo de 168 h en un biorreactor de 5 l se presentan en la Figura 15. La curva de crecimiento representada es habitual para varios crecimientos conseguidos en condiciones idénticas. La producción máxima de biomasa se alcanzó después de 120 h, cerca del punto de supresión de fuente de carbono (es decir, glucosa). Esté también en el punto en el que el contenido total de ácido graso de la biomasa alcanzaba un máximo aproximadamente un 70 % de biomasa. De forma interesante, solamente después de 24 h de cultivo, el contenido de DHA alcanzó un máximo de un 30 % de ácido graso total, permaneciendo constante en lo sucesivo a un 20-25 %. Estos resultados son coherentes con los de otras cepas de Traustoquitidos que producen ácido graso, aunque existe una disparidad con respecto a la tasa a la que se producen estas reacciones.

### c) Discusión

**[0360]** Anteriormente, la mayoría de los estudios identificaban cepas de Labyrinturomycota que son incapaces de almacenar ácido graso total en cantidades superiores a un 20 % de biomasa. Por ejemplo, antes del aislamiento de la cepa SR 21 de *Schizochytrium sp.* que es capaz de acumular hasta un 50 % de biomasa como grasa, *T. aureum* era el mejor acumulador a un 20 % (Bajpai *et al.*, J Am Oil Chem Soc 68: 509-514 (1991)). La cepa de ONC-T18, por otro lado, es capaz de acumular hasta un 80 % de su biomasa como lípido.

**[0361]** Para microorganismos oleaginosos tales como ONC-T18 para acumular aceite, por lo general se debería cultivar en medio de cultivo con una cantidad limitada de nitrógeno (normalmente agotado después de 24 a 36 h) y cantidades abundantes de una fuente de carbono. Una vez que el nitrógeno se suprime, los microbios oleaginosos

continúan asimilando la gente de carbono pero ya no son capaces de experimentar división celular debido a una falta de nitrógeno (evitando de este modo la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos). El resultado es la conversión de estas fuentes de carbono (es decir, azúcares tales como glucosa) en aceites de almacenamiento. En este sentido, se considera que la cepa ONC-T18 crece más lentamente que otras cepas de Traustoguitridos, tales como G13 (Bowles *et al.*, J Biotechnol 70: 193-202 (1999) y Huang *et al.*, Mar Biotechnol 5: 450-457 (2003), aunque produce DHA a tasas más rápidas y demuestra una capacidad única para incorporar cantidades elevadas de ácidos grasos totales. Por último, la capacidad de ONC-T18 para crecer a concentraciones salinas muy bajas con productividad elevada tanto de biomasa como de ácido graso total es notable. De este modo se presta a ampliarse mediante la negación de la naturaleza corrosiva del agua salada en el equipo de fermentación industrial.

10

#### 14. Ejemplo 14: Suplementos del compuesto (antagonista de ácido graso)

##### a) Suplemento de Setoxidim

15 **[0362]** Los medios que contenían 25 g/l de sal marina y 1 g/l de extracto de levadura se trataron en autoclave a 120 °C durante 20 minutos. Se añadió glucosa esterilizada a los medios a una concentración de 9 g/l. El Setoxidim (Supleco) se disolvió en dimetilsulfóxido a una concentración de 5 mg/ml y a continuación se añadió a los medios para representar una concentración final de 100 µM. Se añadió 1 ml de un cultivo previo de 24 horas de ONC-T18 que se había cultivado en los mismos medios. El cultivo se realizó en un agitador (130 rpm) durante cuatro días a temperatura ambiente. Después del periodo de incubación, las células se cosecharon mediante centrifugación a 4300 rpm durante 10 minutos. A continuación, los sedimentos celulares se liofilizaron, se pesaron y el aceite se extrajo de las células.

25 **[0363]** Los lípidos se extrajeron y se derivatizaron a ésteres dimetilo de ácido graso (FAME) para análisis de cromatografía de gas (GC). La transesterificación y la extracción se realizaron usando 200 mg de células liofilizadas, con C19:0 como patrón interno, se añadió a la mezcla de reacción de transesterificación (metanol: ácido clorhídrico:cloroformo, 10:1:1) se mezcló y se calentó a 90 °C durante 2 horas, a continuación se permitió que se enfriara a temperatura ambiente. Los FAME se extrajeron mediante adición de 1 ml de agua, y 2 ml de hexano:cloroformo (4:1), y se permitió que las fases orgánica y acuosa se separaran. La fase orgánica se extrajo y se trató con 0,5 g de sulfato sódico anhidro para retirar partículas y agua residual. Los disolventes orgánicos se evaporaron en una corriente de argón. Los FAME se volvieron a suspender en 5 ml de iso-octano y se analizaron mediante GC-FID. El porcentaje de conversión se calculó dividiendo el producto producido entre la suma de (el producto producido más el sustrato añadido) y a continuación multiplicando por 100. Los Resultados se muestran en la Figura 11. Los resultados también mostraron que la exposición a setoxidim daba como resultado un aumento del contenido y proporción de DHA acumulado en la cepa ONC-T18.

35

##### b) Ejemplo 2: Suplemento de Cerulenina

40 **[0364]** Los medios que contenían 6 g/l de sal marina, 2 g/l de extracto de levadura, y 8 g/l de hidrato de sal monosódica del ácido L-glutámico se trataron en autoclave a 120 °C durante 20 minutos. A continuación, se añadió D+ glucosa esterilizada a este medio a una concentración de 40 g/l. La Cerulenina disuelta en etanol a una concentración de 5 mg/ml se añadió a matraz de 250 ml y el disolvente se evaporó durante 1 hora antes de la adición del medio al matraz. La cantidad de cerulenina en el matraz representaba una concentración final de 20 mg/l. La cepa ONC-T18 se añadió a continuación al medio a partir de un cultivo en plata y el cultivo se produjo en un agitador (130 rpm) a temperatura ambiente durante cuatro días. Después del periodo de incubación, las células se cosecharon mediante centrifugación a 4300 rpm durante 10 minutos, se lavaron una vez con agua destilada, y a continuación se centrifugaron de nuevo a 4300 rpm durante 10 minutos. A continuación, los sedimentos celulares se liofilizaron, se pesaron y el aceite se extrajo de las células.

45

50 **[0365]** Los lípidos se extrajeron y se derivatizaron a ésteres dimetilo de ácido graso (FAME) para análisis de cromatografía de gas (GC). La transesterificación y la extracción se realizaron usando 200 mg de células liofilizadas, con C19:0 como patrón interno, se añadió a la mezcla de reacción de transesterificación (metanol: ácido clorhídrico:cloroformo, 10:1:1) se mezcló y se calentó a 90 °C durante 2 horas, a continuación se permitió que se enfriara a temperatura ambiente. Los FAME se extrajeron mediante adición de 1 ml de agua, y 2 ml de hexano:cloroformo (4:1), y se permitió que las fases orgánica y acuosa se separaran. La fase orgánica se extrajo y se trató con 0,5 g de sulfato sódico anhidro para retirar partículas y agua residual. Los disolventes orgánicos se evaporaron en una corriente de argón. Los FAME se volvieron a suspender en 5 ml de iso-octano y se analizaron mediante GC-FID. El porcentaje de conversión se calculó dividiendo el producto producido entre la suma de (el producto producido + el sustrato añadido) y a continuación multiplicando por 100. Los resultados se muestran en la Figura 11. Los resultados también muestran que la exposición a cerulenina daba como resultado un aumento del contenido y proporción de DHA acumulado en la cepa ONC-T18.

60

**c) Ejemplo 3: Suplemento de ácido oleico (ejemplo de trabajo)**

**[0366]** Los medios que contenían 6 g/l de sal marina, 2 g/l de extracto de levadura, y 8 g/l de hidrato de sal monosódica del ácido L-glutámico se trataron en autoclave a 120 °C durante 20 minutos. A continuación, se añadió D(+)- glucosa esterilizada a una concentración de 5 g/l o no se añadió a los medios. Se añadió ácido oleico a los medios para representar una concentración final de 2 ml/l. La cepa ONC-T18 se añadió a continuación a los medios a partir de un inóculo de un día que se había cultivado en medio de Windust (5 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de peptona, 40 g/l de D(+)-glucosa, 1,25 ml/l de elementos traza de Windust, 1,25 ml/l de vitaminas de Windust, 40 g/l de sal marina; (elementos traza de Windust: 5 g/l de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 3,15 g/l de FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 4,36 g/l de Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O, 0,6125 mg/l de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0,0597g/l de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0,022 g/l de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,01 g/l de CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0,18 g/l de MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 13 µg/l de H<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, 2,7 mg/l de NiSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1,84 mg/l de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1,94 mg/l de K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>), (vitaminas de Windust: 1 mg/l de vitamina B12, 1 mg/l de biotina, 0,20 g/l de tiamina HCl)). El cultivo se produjo en un agitador (130 rpm) durante 3 días a temperatura ambiente. Después del periodo de incubación, las células se cosecharon mediante centrifugación a 4300 rpm durante 10 minutos, se lavaron una vez con agua destilada, y a continuación se centrifugaron de Novoa 4300 rpm durante 10 minutos. A continuación, los sedimentos celulares se liofilizaron, se pesaron y el aceite se extrajo de las células.

**[0367]** Los lípidos se extrajeron y se derivatizaron a ésteres dimetilo de ácido graso (FAME) para análisis de cromatografía de gas (GC). La transesterificación y la extracción se realizaron usando 200 mg de células liofilizadas, con C19:0 como patrón interno, se añadió a la mezcla de reacción de transesterificación (metanol: ácido clorhídrico: cloroformo, 10:1:1) se mezcló y se calentó a 90 °C durante 2 horas, a continuación se permitió que se enfriara a temperatura ambiente. Los FAME se extrajeron mediante adición de 1 ml de agua, y 2 ml de hexano:cloroformo (4:1), y se permitió que las fases orgánica y acuosa se separaran. La fase orgánica se extrajo y se trató con 0,5 g de sulfato sódico anhidro para retirar partículas y agua residual. Los disolventes orgánicos se evaporaron en una corriente de argón. Los FAME se volvieron a suspender en 5 ml de iso-octano y se analizaron mediante GC-FID. El porcentaje de conversión se calculó dividiendo el producto producido entre la suma de (el producto producido + el sustrato añadido) y a continuación multiplicando por 100. Los resultados se muestran en la Figura 11. Los resultados también muestran que el suplemento de ácido oleico daba como resultado un aumento del contenido y proporción de DHA acumulado en la cepa ONC-T18.

**d) Ejemplo 4: Suplemento de Capsaicina**

**[0368]** Los medios que contenían 6 g/l de sal marina y 10 g/l de extracto de levadura se trataron en autoclave a 120 °C durante 20 minutos. A continuación, se añadió D(+)- glucosa esterilizada a los medios a una concentración de 40 g/l. A continuación, se pusieron 50 ml de este medio en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. La capsaicina (Sigma) se disolvió en etanol a una concentración de 10 g/l y se añadió al medio para representar una concentración final de 0,1 g/l. La cepa ONC-T18 se añadió al medio desde un cultivo en placa y se cultivó en un agitador (130 rpm) a temperatura ambiente durante cuatro días. Después del periodo de incubación, las células se cosecharon mediante centrifugación a 4300 rpm durante 10 minutos, se lavaron una vez con agua destilada, and y a continuación se centrifugaron de nuevo a 4300 rpm durante 10 minutos. A continuación, los sedimentos celulares se liofilizaron, se pesaron y el aceite se extrajo de las células.

**[0369]** Los lípidos se extrajeron y se derivatizaron a ésteres dimetilo de ácido graso (FAME) para análisis de cromatografía de gas (GC). La transesterificación y la extracción se realizaron usando 200 mg de células liofilizadas, con C19:0 como patrón interno, se añadió a la mezcla de reacción de transesterificación (metanol: ácido clorhídrico: cloroformo, 10:1:1) se mezcló y se calentó a 90 °C durante 2 horas, a continuación se permitió que se enfriara a temperatura ambiente. Los FAME se extrajeron mediante adición de 1 ml de agua, y 2 ml de hexano: cloroformo (4:1), y se permitió que las fases orgánica y acuosa se separaran. La fase orgánica se extrajo y se trató con 0,5 g de sulfato sódico anhidro para retirar partículas y agua residual. Los disolventes orgánicos se evaporaron en una corriente de argón. Los FAME se volvieron a suspender en 5 ml de iso-octano y se analizaron mediante GC-FID. El porcentaje de conversión se calculó dividiendo el producto producido entre la suma de (el producto producido + el sustrato añadido) y a continuación multiplicando por 100. Los resultados se muestran en la Figura 11. Los resultados también muestran que la exposición a capsaicina daban como resultado una disminución del contenido de C16:0 y un aumento del contenido de C16:1 en la cepa ONC-T18.

**e) Ejemplo 5: Adición de Ácido Toluico**

**[0370]** Los medios que contenían 20 g/l de sal marina y 10 g/l de extracto de levadura se trataron en autoclave a 120 °C durante 20 minutos. A continuación, se añadió D(+)-glucosa esterilizada a los medios a una concentración de 20 g/l. A continuación, se pusieron 50 ml de este medio en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se añadió ácido toluico (Sigma) disuelto en etanol a una concentración de 20 g/l al medio para representar una concentración final de 0,2 g/l. La cepa ONC-T18 se añadió en el medio desde un cultivo en placa y se cultivó en un agitado (130 rpm) a temperatura ambiente durante cuatro días. Después del periodo de incubación, las células cultivadas se recuperaron mediante centrifugación a 4300 rpm durante 10 minutos, se lavaron una vez con agua destilada, y se volvieron a centrifugar. Los sedimentos celulares se liofilizaron, se pesaron y el aceite se extrajo de las células. (Ejemplo 19)

**[0371]** Los lípidos se extrajeron y se derivatizaron a ésteres dimetilo de ácido graso (FAME) para análisis de cromatografía de gas (GC). La transesterificación y la extracción se realizaron usando 200 mg de células liofilizadas, con C19:0 como patrón interno, se añadió a la mezcla de reacción de transesterificación (metanol: ácido clorhídrico: cloroformo, 10:1:1) se mezcló y se calentó a 90 °C durante 2 horas, a continuación se permitió que se enfriara a temperatura ambiente. Los FAME se extrajeron mediante adición de 1 ml de agua, y 2 ml de hexano: cloroformo (4:1), y se permitió que las fases orgánica y acuosa se separaran. La fase orgánica se extrajo y se trató con 0,5 g de sulfato sódico anhidro para retirar partículas y agua residual. Los disolventes orgánicos se evaporaron en una corriente de argón. Los FAME se volvieron a suspender en 5 ml de iso-octano y se analizaron mediante GC-FID. El porcentaje de conversión se calculó dividiendo el producto producido entre la suma de (el producto producido + el sustrato añadido) y a continuación multiplicando por 100. Los Resultados se muestran en la Figura 11. Los resultados también muestran que el ácido toluico daba como resultado un aumento de la proporción de EPA y DPA n-3 y una disminución de la proporción de DPA (n-6) y DHA- posiblemente un inhibidor de la  $\Delta$ 4-desaturasa en la cepa ONC-T18.

#### 15 f) Ejemplo 6: Adición de Norflurazón

**[0372]** 50 ml de medio que contenía 25 g/l de sal marina y 1 g/l de extracto de levadura se trataron en autoclave a 120 °C durante 20 minutos. A continuación, se añadió D(+)-glucosa esterilizada al medio a una concentración de 9 g/l. A continuación, se pusieron 50 ml de este medio en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. El Norflurazón (Supleco) se disolvió en dimetilsulfóxido a una concentración de 20 g/l y a continuación se añadió a los medios para representar una concentración final de 0,2 g/l. Se añadió 1 ml un cultivo previo (inóculo) de 24 horas de la cepa ONC-T18 que se había cultivado en el mismo medio (25 g/l de sal marina, 1 g/l de extracto de levadura, 9 g/l de glucosa). El cultivo se realizó en un agitador (130 rpm) durante cuatro días a temperatura ambiente. Después del periodo de incubación, las células se cosecharon mediante centrifugación a 4300 rpm durante 10 minutos, se lavaron una vez con agua destilada, y a continuación se centrifugaron de nuevo a 4300 rpm durante 10 minutos. A continuación, los sedimentos celulares se liofilizaron, se pesaron y el aceite se extrajo de las células.

**[0373]** Los lípidos se extrajeron y se derivatizaron a ésteres dimetilo de ácido graso (FAME) para análisis de cromatografía de gas (GC). La transesterificación y la extracción se realizaron usando 200 mg de células liofilizadas, con C19:0 como patrón interno, se añadió a la mezcla de reacción de transesterificación (metanol: ácido clorhídrico: cloroformo, 10:1:1) se mezcló y se calentó a 90 °C durante 2 horas, a continuación se permitió que se enfriara a temperatura ambiente. Los FAME se extrajeron mediante adición de 1 ml de agua, y 2 ml de hexano:cloroformo (4:1), y se permitió que las fases orgánica y acuosa se separaran. La fase orgánica se extrajo y se trató con 0,5 g de sulfato sódico anhidro para retirar partículas y agua residual. Los disolventes orgánicos se evaporaron en una corriente de argón. Los FAME se volvieron a suspender en 5 ml de iso-octano y se analizaron mediante GC-FID. El porcentaje de conversión se calculó dividiendo el producto producido entre la suma de (el producto producido + el sustrato añadido) y a continuación multiplicando por 100. Los Resultados se muestran en la Figura 11. Los resultados también muestran que la exposición a norflurazon da como resultado un aumento del contenido y la proporción de DHA acumulado en la cepa ONC-T18.

40

#### Listado de secuencias

##### [0374]

45 <110> OCEAN NUTRITION CANADA (LTD.)

Helia Radianingtyas

Adam Martin Burja

Colin James Barrow

50 <120> CONSORCIOS DE EUCARIOTAS Y PROCARIOTAS PARA PRODUCIR LÍPIDOS Y ANTIOXIDANTES Y MICROORGANISMOS EUCARIOTAS PARA PRODUCIR LÍPIDOS Y ANTIOXIDANTES

<130> 15113.0012P2

55 <140> PCTUS0774722

<141> 30-07-2007

<150> 60/821.084

<151> 01-08-2006

60

<160> 1

<170> FastSEQ para versión 4.0 de Windows

65 <210> 1

ES 2 572 833 T3

<211> 1724  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: nota = construcción sintética

<400> 1

10

```

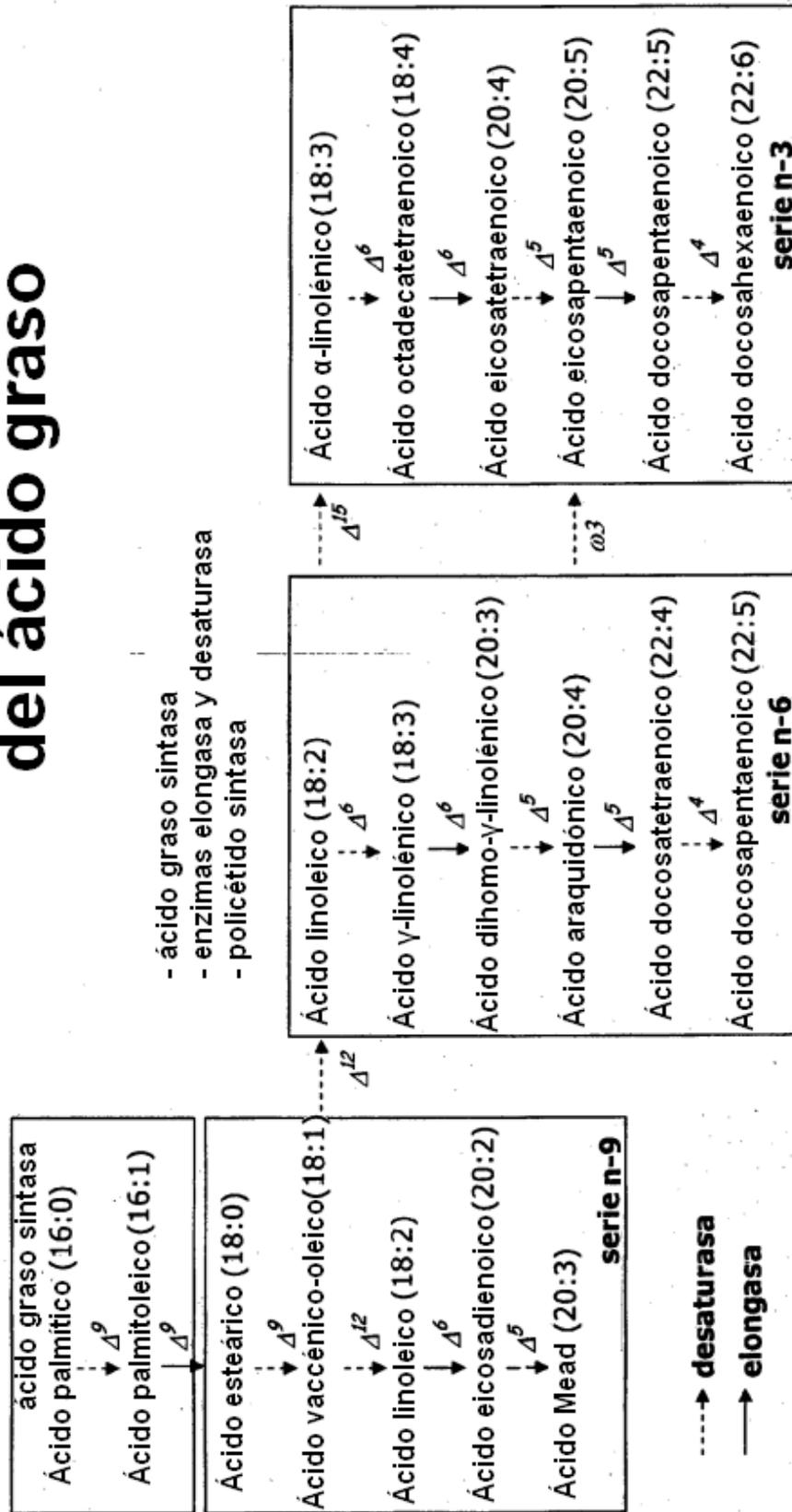
dgtagtcata cgctcgtctc aaagattaag ccatgcatgt gtaagtataa gcgattatac 60
tgtgagactg cgaacggctc attatatcag ttatgatttc ttcggatttt tctttatatt 120
gatacctgca gtaattctgg aattaataca tgctgagagg gcccgactgt tccggagggc 180
cgcaacttatt agagttgaag ccaagtaaga tggtagtca tgataattga gcagatcgct 240
tgtttgagc gatgaatcgt ttgagtttct gcccatcag ttgtcgacgg tagtgtattg 300
gactacgggt actataacgg gtgacgggga gttagggtc gactccggag agggagcctg 360
agagacggct accacatcca aggaaggcag caggcgcgta aattaccca tgtggactcc 420
acgaggtagt gacgagaaat atcaatgocg gccgcttcgc gtcttgctat tggatgaga 480
gcaatgtaaa accctcatcg aggatcaact ggagggcaag tctggtgcca gcagccggcg 540
taattccagc tccagaagcg tatgctaaag ttgttgacgt taaaagctc gtagttgaat 600
ttctggggcg ggagccccgg tctttgcgcg actgcctct gtttgccgag cggctcctct 660

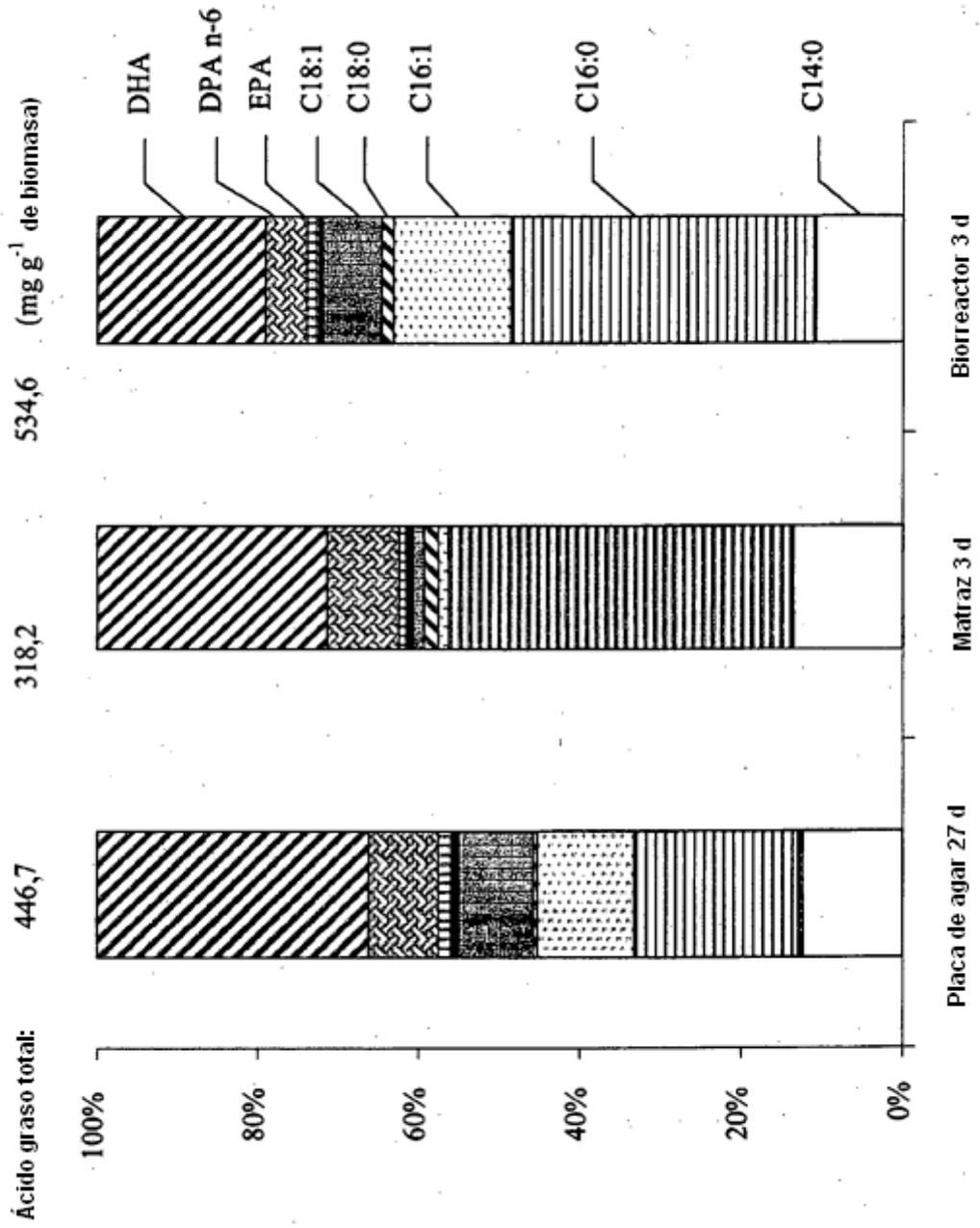
gccatcctcg cctctttttt tagtggcgtc gttcactgta attaaagcag agtgttccaa 720
gcaggtcgta tgacctgat gtttattatg ggatgatcag atagggctcg ggtgctattt 780
tgttggtttg cacatctgag taatgatgaa taggaacagt tgggggtatt cgtatttagg 840
agctagaggt gaaattcttg gatttccgaa agacgaacta cagcgaaggc atttaccaag 900
catgttttca ttaatcaaga acgaaagtct ggggatcgaa gatgattaga taccatcgta 960
gtctagaccg taaacgatgc cgacttgcga ttgcgggggtg tttgtattgg accctcgcag 1020
cagcacatga gaaatcaaag tctttgggtt ccggggggag tatggtcgca aggctgaaac 1080
ttaaaggaat tgacggaagg gcaccaccag gagtggagcc tgcggcttaa tttgactcaa 1140
cacgggaaaa cttaccaggt ccagacatag gtaggattga cagattgaga gctctttctt 1200
gattctatgg gtggtggtgc atggccggtc ttagttggtg gaggatttg tctggttaat 1260
tccgttaacg aacgagacct cggcactact aatagcggtg ggtatggcga catacttgcg 1320
tacgcttctt agagggacat gttcgggtata cgagcaggaa gttcgaggca ataacaggtc 1380
tgtgatgcc tttagatgtc tgggcgcac gccgcgtaca ctgatgggtt caacgggtgg 1440
tcatcgttgt tcgcagcgag gtgctttgcc ggaaggcatg gcaaatcctt tcaacgocca 1500
tcgtgctggg gctagatttt tgcaattatt aatctccaac gaggaattcc tagtaaaccg 1560
aagtcacatc cttgcattga atacgtccct gccctttgta cacaccgccc gtcgcacctc 1620
ccgattgaac ggtccgatga aaccatggga tgacctttg agcgtttggt cgcgaggggg 1680
gtcagaactc gggatgaatct tattgtttag aggaaggatg agtc 1724
    
```

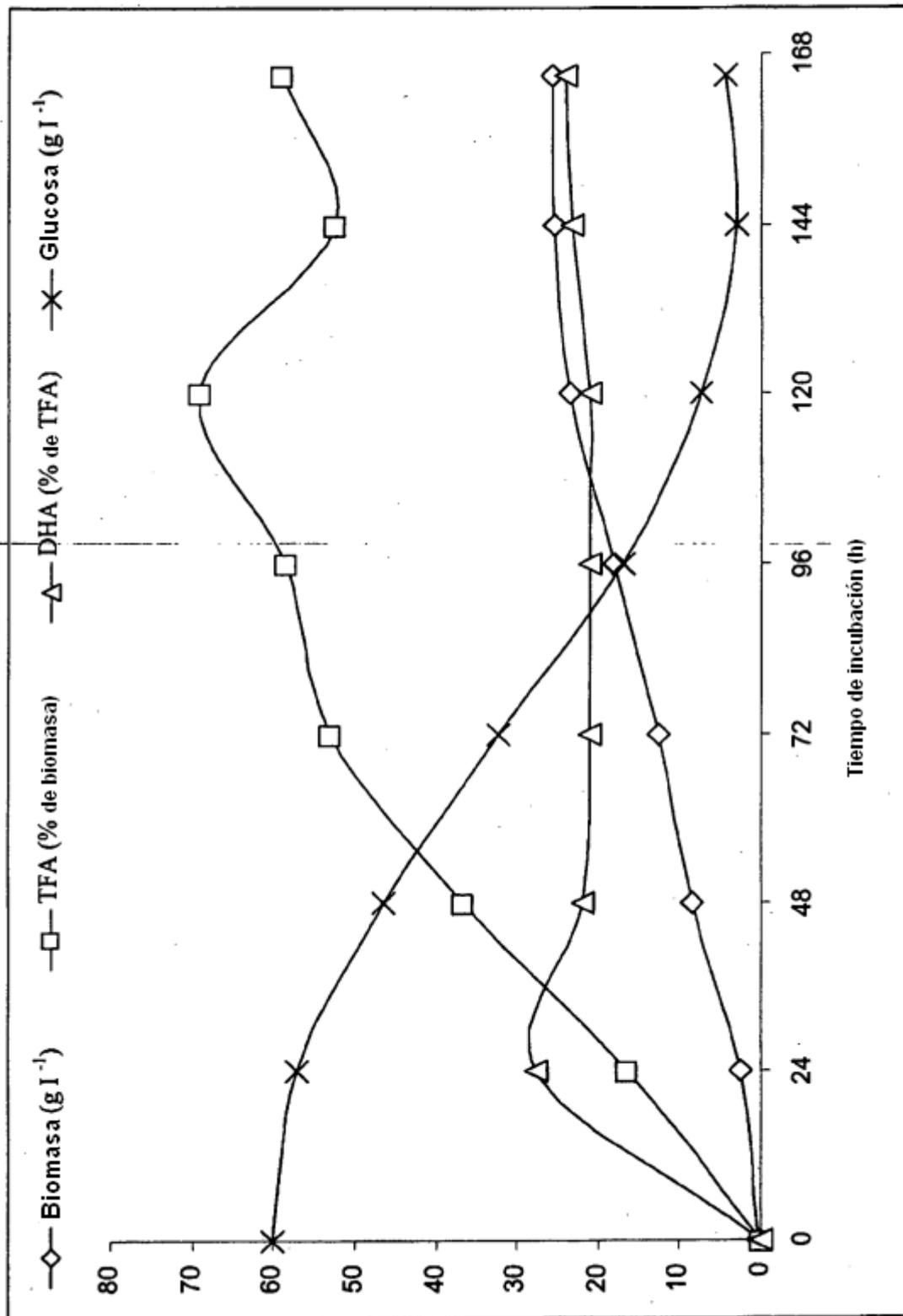
**REIVINDICACIONES**

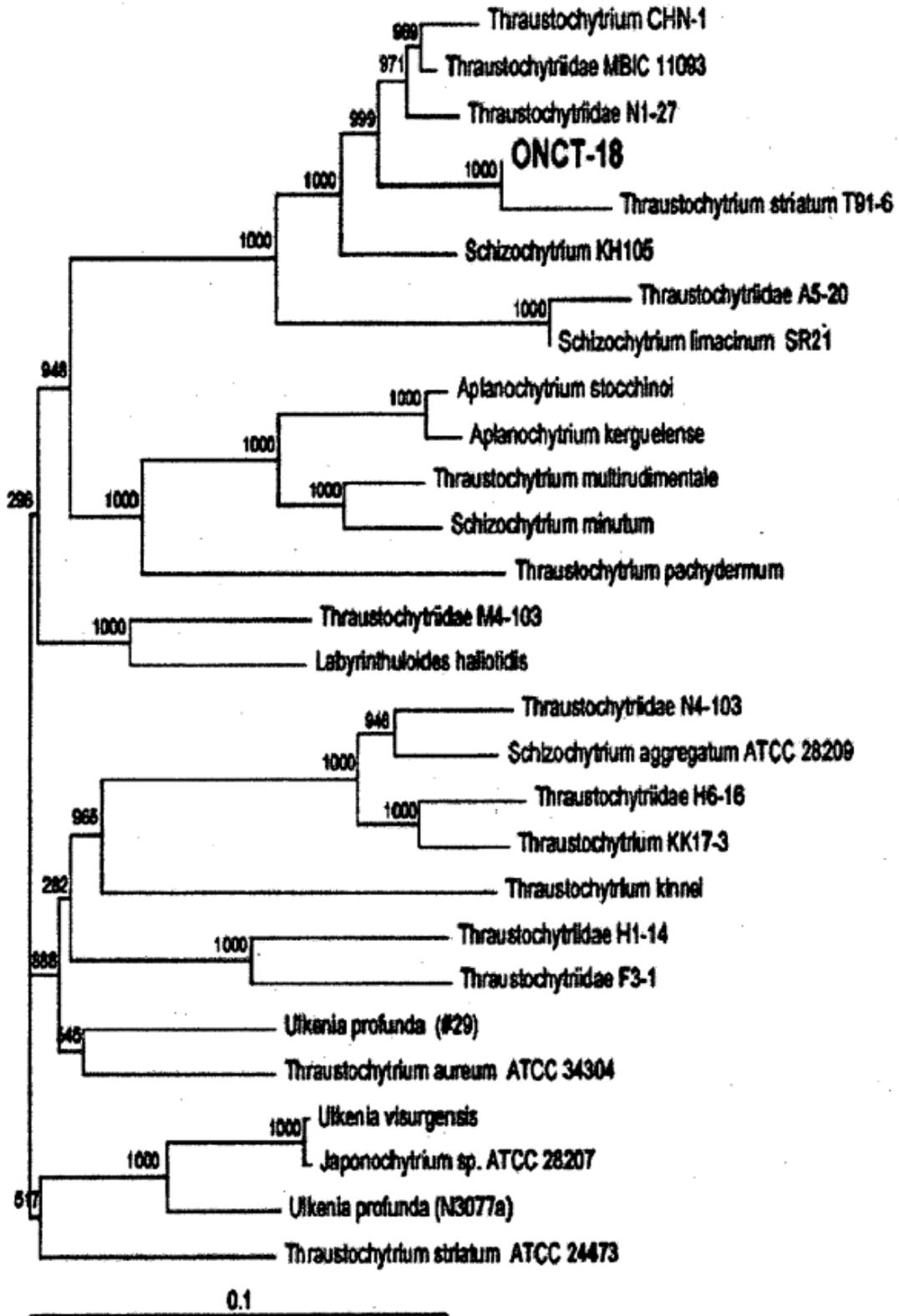
1. Un procedimiento para preparar una composición lipídica, comprendiendo el procedimiento: cultivar un microbio productor de aceite en un medio heterotrófico que comprende un antagonista de la producción de ácido graso, en el que el microbio productor de aceite tiene una secuencia 18S, en el que la secuencia 18S tiene una identidad de al menos un 97 % con la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1, y donde el antagonista de la producción de ácido graso es el ácido oleico.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente aislar la composición lipídica.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la proporción de ácidos grasos omega-3 y omega-6 con respecto a ácidos grasos omega-9 aumenta en comparación con un control en el que no se añade al medio un antagonista de la producción de ácido graso.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que el contenido total de ácido graso está inalterado en comparación con un control en el que no se añade al medio un antagonista de la producción de ácido graso.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el microbio productor de aceite es
  - a) del filo *Labyrinthulomycota*,
  - b) de la clase *Labyrinthulomycetes*,
  - c) de la subclase *Thraustochytridae*,
  - d) del orden *Thraustochytriales*, o
  - e) de la familia *Thraustochytriaceae*.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el microbio productor de aceite es
  - a) del género *Thraustochytrium*, o *Thraustochytrium* sp., o se selecciona del grupo que consiste en *Thraustochytrium aureum*, *Thraustochytrium roseum* o *Thraustochytrium striatum*, o
  - b) del género *Schizochytrium* o *Schizochytrium* sp.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el microbio productor de aceite es PTA-6245.

# Ruta metabólica postulada del ácido graso

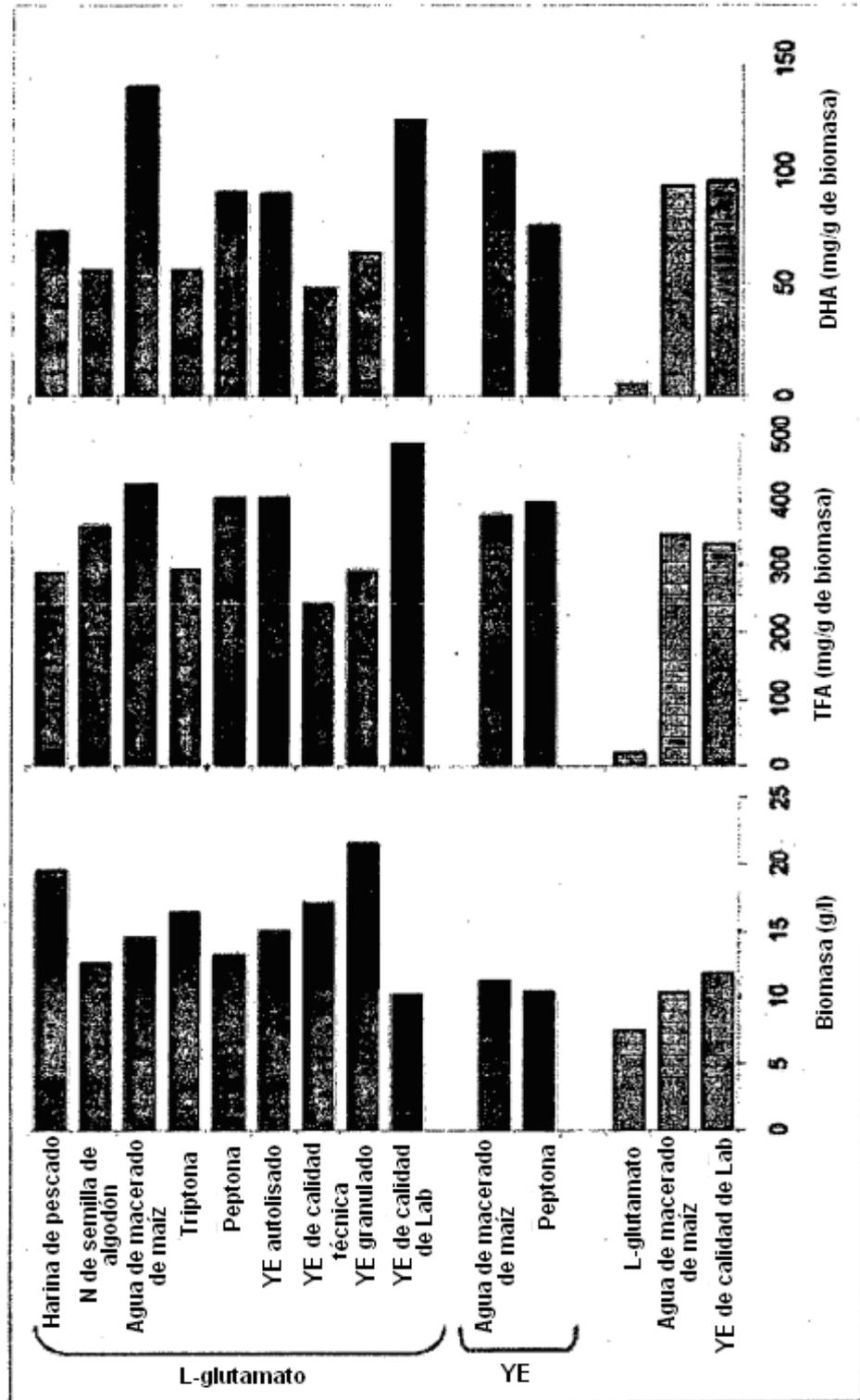




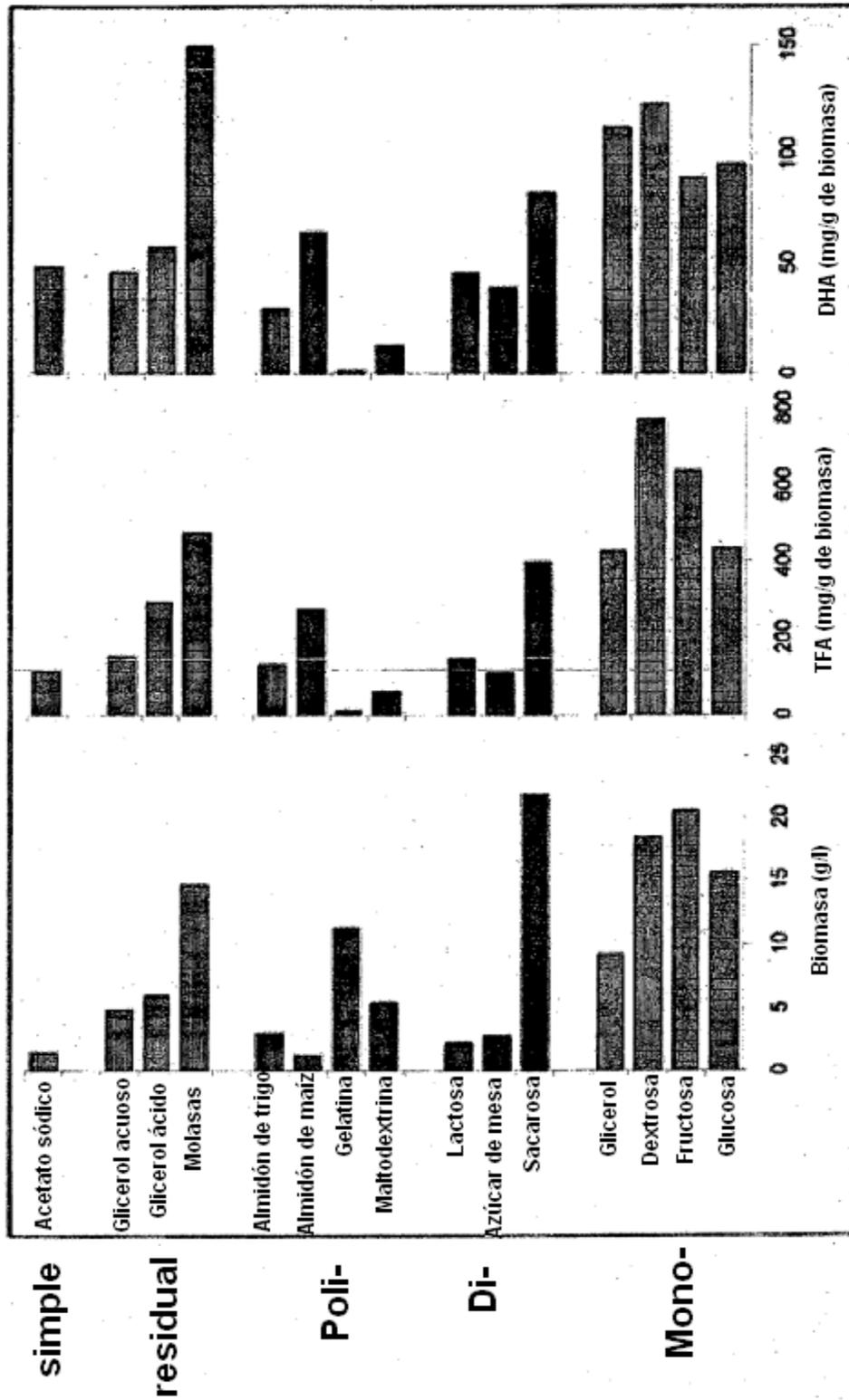




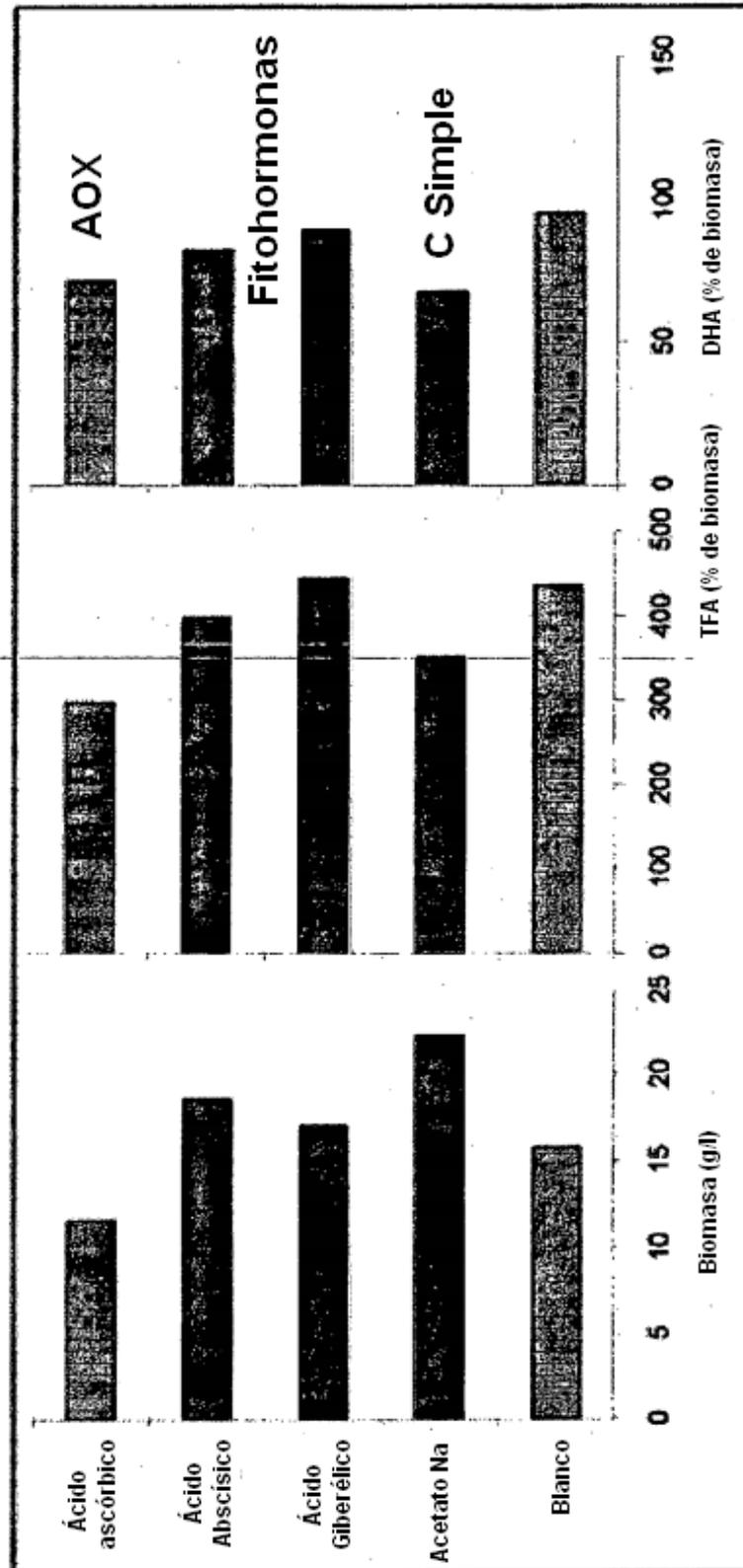
# Utilización de nitrógeno



# Utilización de carbono

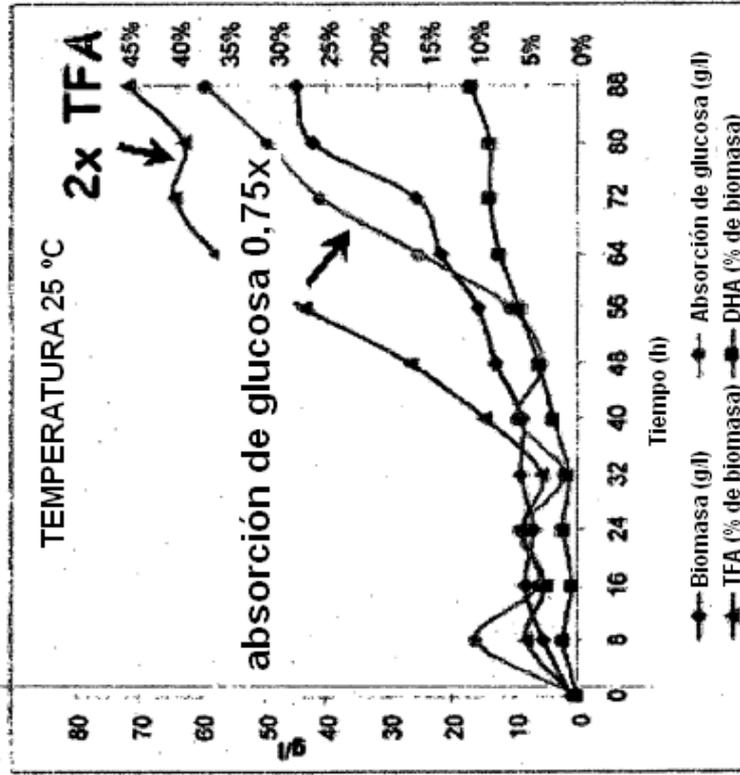
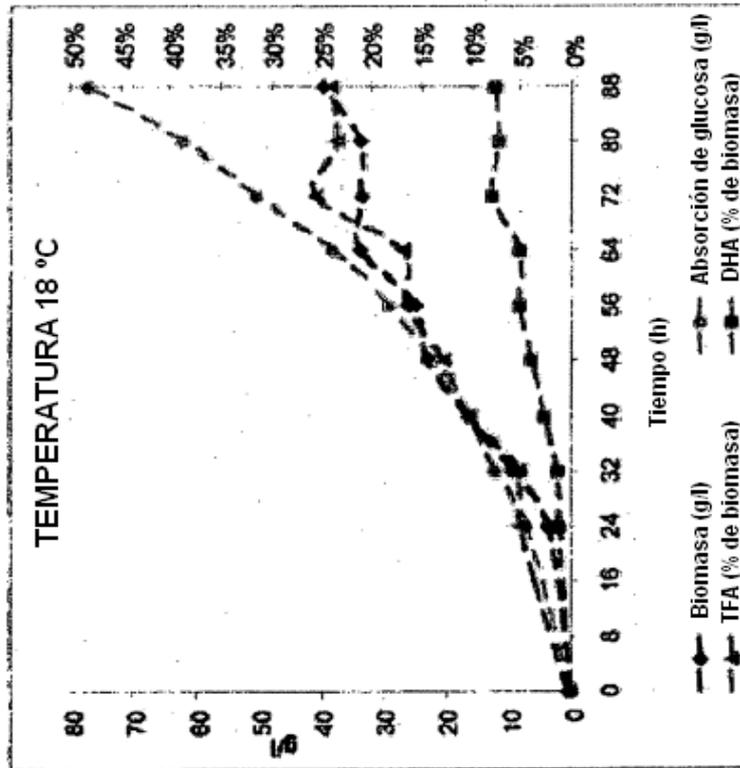


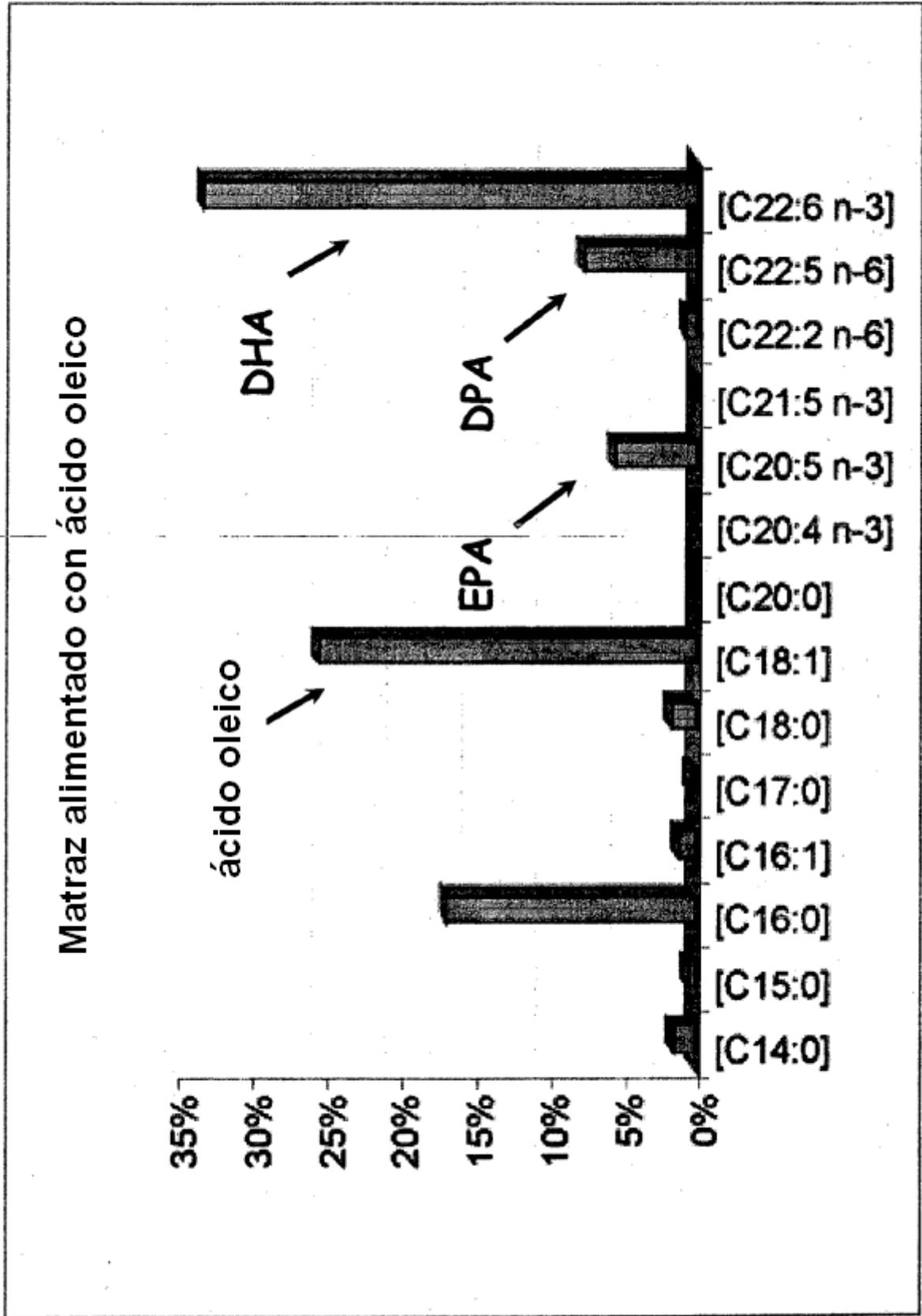
# Suplemento



## Efecto de la temperatura

### Proporción de Glucosa : TFA 8,1 con respecto a 3,0





Medios	Lípido (mg/g)	DHA (% de Lípido)	EPA (% de Lípido)	DPAn6 (% de Lípido)	Proporción de EPADPAn6	Proporción de EPA/DHA
Control	344	31	2,8	10,1	0,278	0,090
0,2 g/l de Ácido Toluico	450	31	6,6	5,9	1,119	0,213

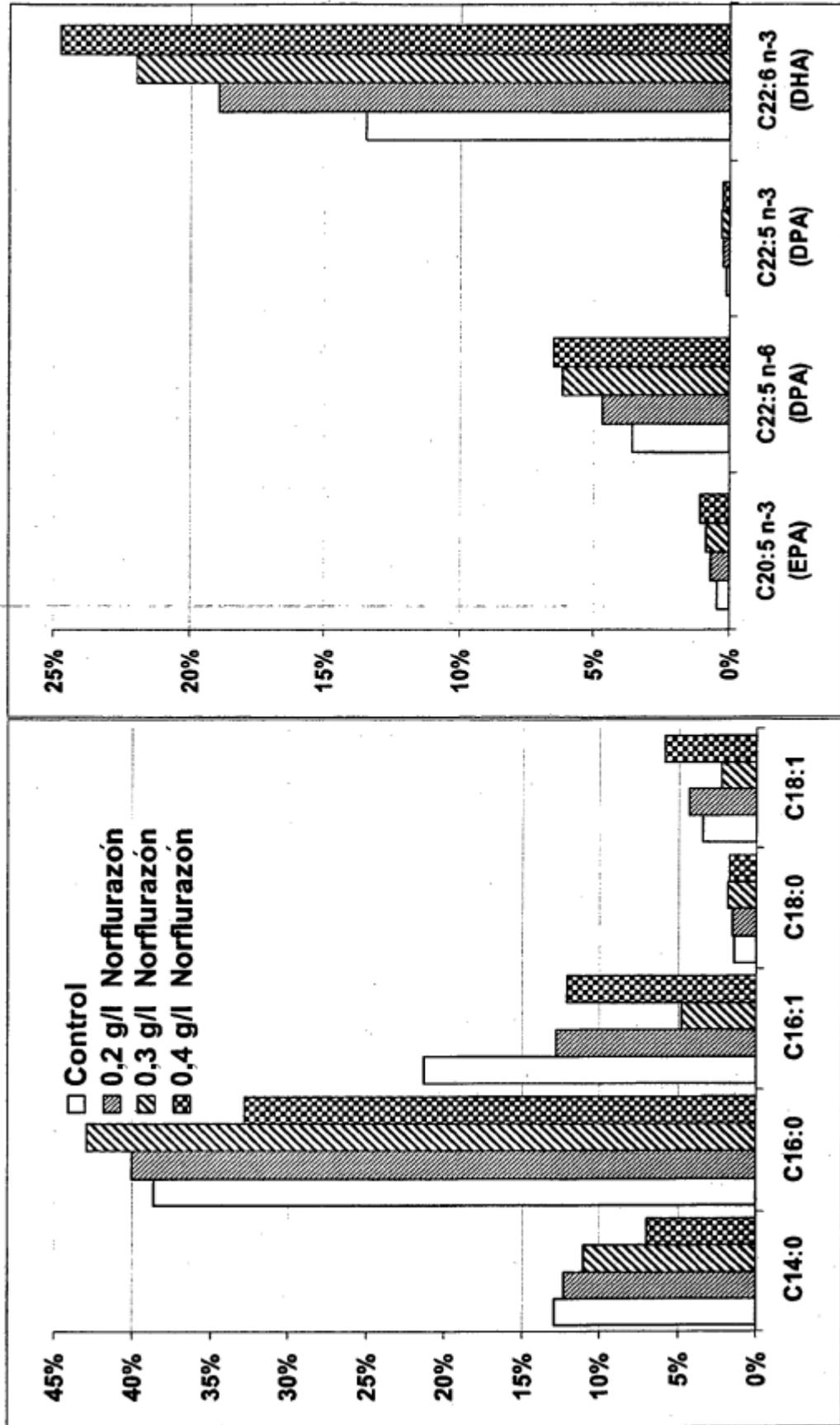
Antagonista	[C14:0]	% de TFA	[C14:1]	% de TFA	[C15:0]	% de TFA	[C15:1]	% de TFA	[C16:0]	% de TFA	[C16:1]	% de TFA	[C17:0]	% de TFA	[C18:0]	% de TFA
Control	36,91	11,27	0,00	0,23	20,36	3,92	1,19	0,43	209,79	46,57	12,93	11,63	5,79	1,16	8,76	1,84
Setoxidim (100 µM)	59,52	10,97	0,15	0,03	29,34	5,50	2,90	0,53	216,18	40,57	48,97	9,18	7,93	1,40	7,73	1,46
Control	59,46	11,10	0,00	0,00	20,56	3,84	0,57	0,11	270,63	50,52	10,35	1,93	4,57	0,85	8,30	1,55
Cenulenina (20 mg/l)	65,33	11,03	0,00	0,00	19,16	3,23	0,62	0,10	290,18	48,98	13,02	2,20	4,40	0,74	11,00	1,86
Ácido oleico (2 µl)	2,11	1,38	0,00	0,00	0,74	0,49	0,00	0,00	25,35	16,67	1,61	1,06	0,43	0,28	2,37	1,56
Ácido oleico (2 µl) Glucosa (5 µl)	16,96	8,40	0,00	0,00	1,48	0,73	0,00	0,00	67,00	33,18	8,52	4,22	0,34	0,17	3,22	1,60
Control	90,55	24,46	0,10	0,03	9,00	2,43	0,00	0,00	158,50	42,82	1,71	0,46	1,13	0,31	4,67	1,26
Control	79,08	21,86	1,01	0,28	3,31	0,91	0,83	0,23	87,52	24,19	65,04	17,98	0,70	0,19	5,78	1,60
Capsaicina (0,1 µl)	53,08	9,70	0,00	0,00	53,80	9,83	0,61	0,11	237,91	43,48	8,33	1,52	12,53	2,29	8,73	1,59
Control	22,41	11,19	0,00	0,00	29,90	14,93	0,55	0,27	53,86	26,90	4,72	2,36	5,38	2,69	3,19	1,59
Ácido toluico (0,2 µl)	32,44	8,95	0,00	0,00	35,50	9,79	0,46	0,13	119,97	32,80	7,05	1,94	6,86	1,89	4,83	1,28
Control	53,14	11,08	0,59	0,12	15,18	3,16	1,60	0,33	194,80	40,61	51,10	10,65	4,93	1,03	7,30	1,52
Norfurazón (0,2 µl)	62,90	12,36	0,63	0,12	13,81	2,71	1,76	0,35	220,04	43,24	79,08	15,54	4,05	0,80	8,17	1,61
Control																
Antagonista	[C18:1w3]	% de TFA	[C18:1w7]	% de TFA	[C20:0]	% de TFA	[C20:1]	% de TFA	[C20:2w6]	% de TFA	[C20:3w6]	% de TFA	[C20:4w6]	% de TFA	[C20:3w3]	% de TFA
Control	0,00	0,00	12,98	2,89	1,72	0,36	0,91	0,12	1,64	0,38	1,27	0,14	1,24	0,13	0,00	0,00
Setoxidim (100 µM)	0,96	0,18	13,21	2,48	1,09	0,20	0,00	0,00	0,75	0,14	0,51	0,10	1,09	0,20	0,00	0,00
Control	0,71	0,13	4,99	0,93	2,03	0,38	0,00	0,00	0,90	0,17	0,82	0,15	0,88	0,16	0,00	0,00
Cenulenina (20 mg/l)	1,71	0,29	7,35	1,24	2,40	0,41	1,15	0,19	1,00	0,17	1,21	0,20	1,79	0,30	0,00	0,00
Ácido oleico (2 µl)	38,55	25,36	4,08	2,68	0,00	0,00	0,00	0,001	0,77	0,51	0,92	0,61	1,09	0,72	0,00	0,00
Ácido oleico (2 µl) Glucosa (5 µl)	19,17	9,49	8,98	4,45	0,68	0,34	0,60	0,30	0,72	0,36	0,60	0,30	0,93	0,46	0,00	0,00
Control	0,55	0,15	0,95	0,26	1,33	0,36	0,00	0,00	0,23	0,06	0,47	0,13	0,81	0,22	0,00	0,00
Control	0,00	0,00	24,13	6,67	0,73	0,20	0,00	0,00	0,84	0,23	0,81	0,22	2,83	0,78	0,00	0,00
Capsaicina (0,1 µl)	0,54	0,10	6,95	1,27	1,45	0,26	0,00	0,00	0,19	0,03	1,35	0,25	0,96	0,17	0,00	0,00
Control	0,23	0,11	7,37	3,68	0,46	0,23	0,29	0,14	1,58	0,79	0,34	0,17	1,81	0,90	0,16	0,08
Ácido toluico (0,2 µl)	0,06	0,10	5,95	1,64	0,80	0,22	0,06	0,01	0,73	0,20	0,43	0,12	1,37	0,38	0,11	0,03
Control	0,00	0,00	16,96	3,53	0,78	0,16	0,08	0,02	0,61	0,13	0,87	0,18	0,90	0,19	0,00	0,00
Norfurazón (0,2 µl)	0,22	0,04	16,38	3,22	1,17	0,23	0,00	0,00	0,77	0,15	0,55	0,11	0,74	0,14	0,00	0,00

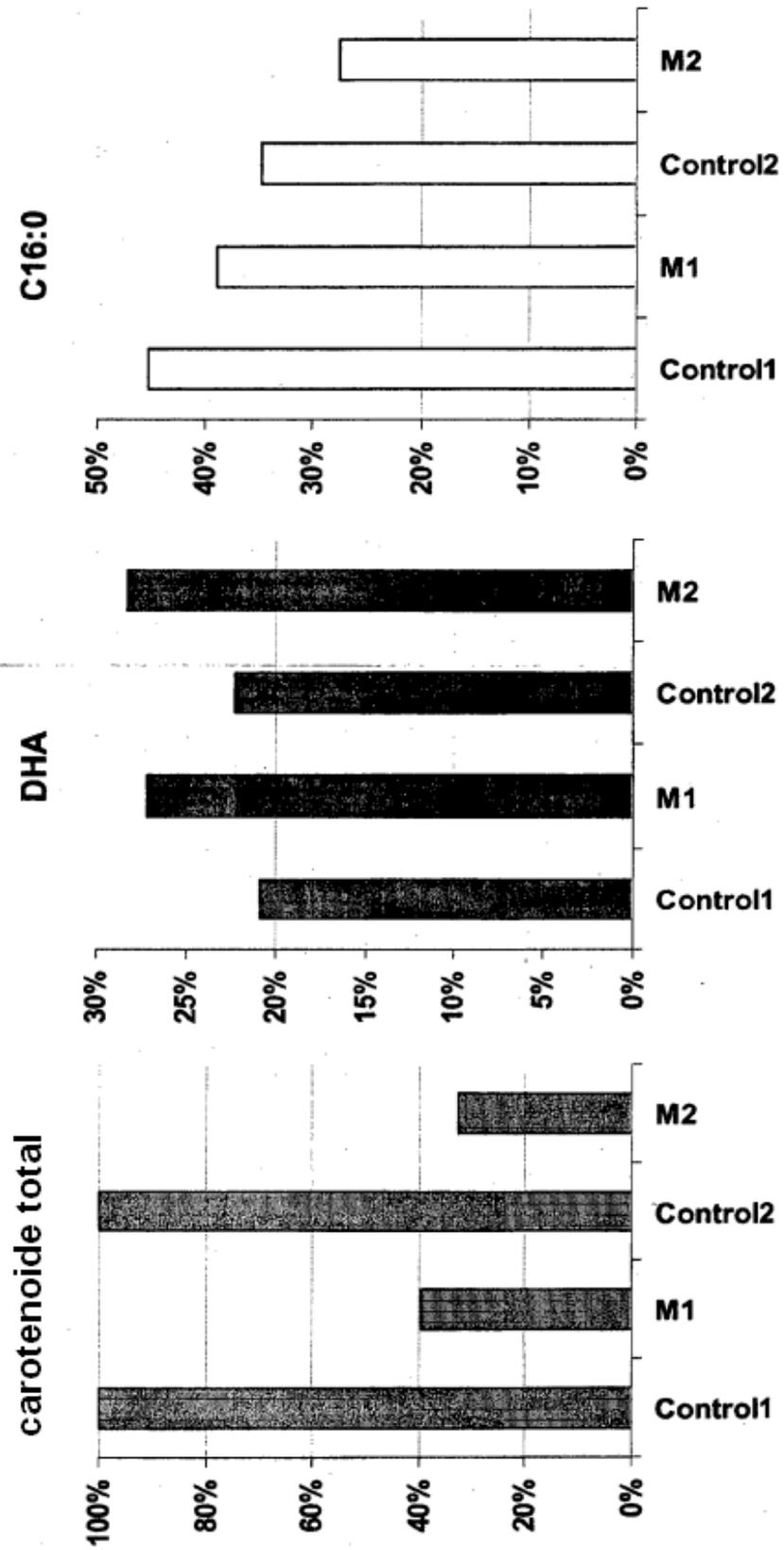
Antagonista	[C20:4w3]	% de TFA	[C20:5w3]	% de TFA	[C22:0]	% de TFA	[C21:5w3]	% de TFA	[C22:2w6]	% de TFA	[C22:4w6]	% de TFA	[C22:5w6]	% de TFA	[C22:5w3]	% de TFA
Control	3,46	0,26	1,09	0,38	0,00	0,00	4,47	1,12	1,25	0,20	1,21	0,16	46,95	3,88	4,34	0,35
Setoxidim (100 µM)	1,97	0,37	4,15	0,78	0,00	0,00	5,84	1,09	0,00	0,00	0,00	0,00	28,04	5,26	1,25	0,24
Control	1,84	0,34	3,85	0,72	0,52	0,10	6,78	1,27	0,71	0,13	0,00	0,00	29,29	5,47	0,84	0,16
Cenulena (20 mg/l)	2,11	0,36	6,94	1,17	0,64	0,11	7,32	1,24	0,84	0,14	0,00	0,00	34,53	5,83	1,39	0,23
Ácido oleico (2 g/l)	0,00	0,00	8,32	5,47	0,00	0,00	0,31	0,20	1,03	0,68	0,92	0,60	11,52	7,58	1,50	0,98
Ácido oleico (2 g/l) Glucosa (5 g/l)	0,49	0,24	5,25	2,60	0,00	0,00	1,60	0,79	0,87	0,43	0,57	0,28	13,05	6,46	0,78	0,39
Control	1,02	0,27	2,30	0,62	0,38	0,10	3,74	1,01	0,53	0,14	0,54	0,14	21,65	5,85	0,52	0,14
Control	0,98	0,27	5,01	1,38	0,00	0,00	0,00	0,00	0,60	0,17	1,86	0,46	18,78	5,19	1,12	0,31
Capsaicina (0,1 g/l)	1,62	0,30	2,65	0,48	0,45	0,08	0,00	0,00	0,70	0,13	0,39	0,07	35,76	6,53	1,21	0,22
Control	0,72	0,36	5,91	2,95	0,00	0,00	0,78	0,39	0,11	0,06	0,93	0,46	11,92	5,95	1,09	0,54
Ácido toluico (0,2 g/l)	1,39	0,38	4,21	1,16	0,00	0,00	1,57	0,43	0,33	0,09	0,67	0,19	34,21	9,43	0,98	0,27
Control	1,17	0,24	3,65	0,76	0,25	0,05	0,00	0,00	0,15	0,03	0,81	0,17	25,09	5,23	0,90	0,19
Norfurazón (0,2 g/l)	0,68	0,13	2,65	0,52	0,37	0,07	0,00	0,00	0,54	0,11	1,16	0,23	20,25	3,98	0,89	0,13
Control																

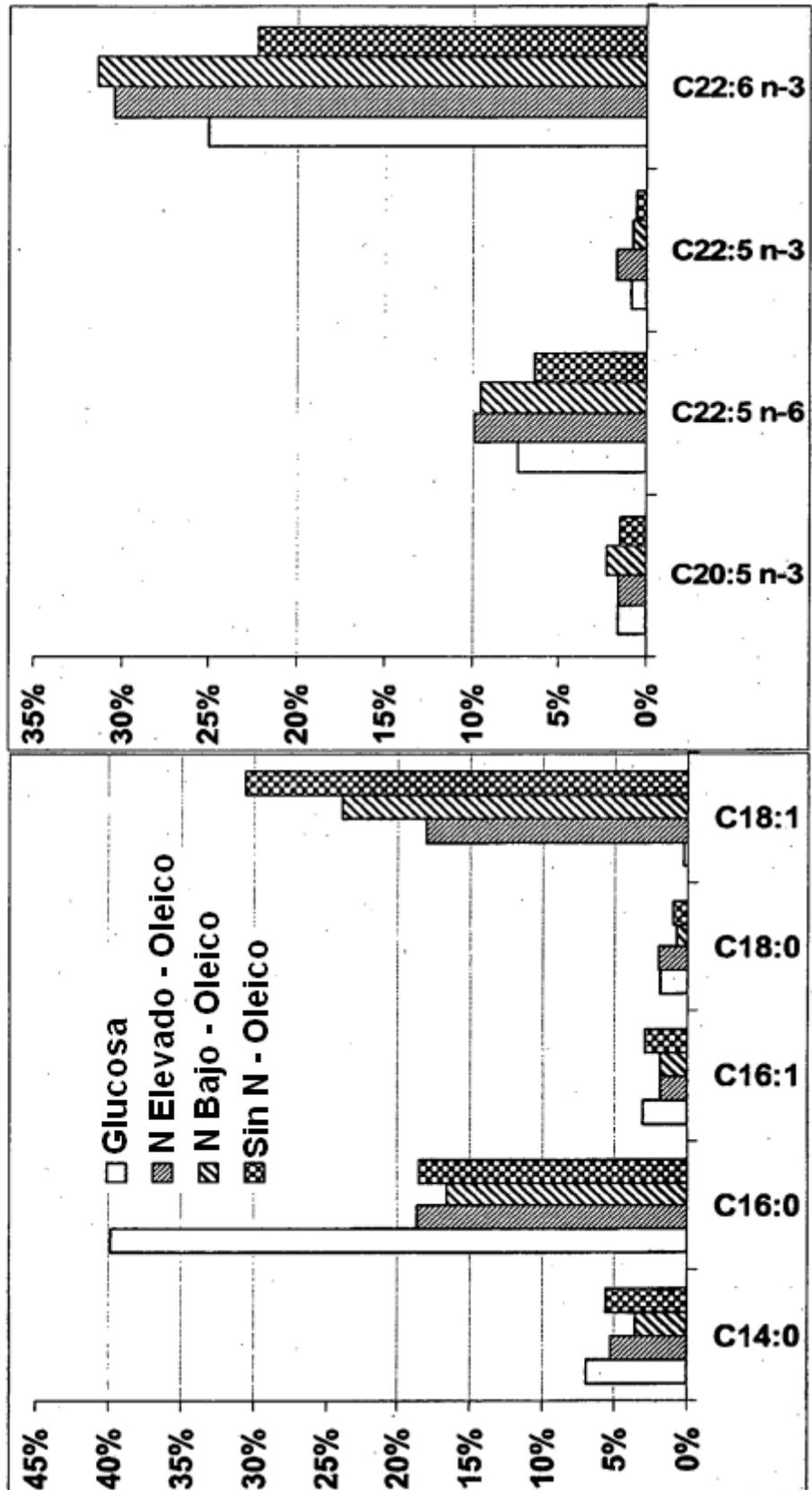
Clave:  
[Cxx]  
% de TFA

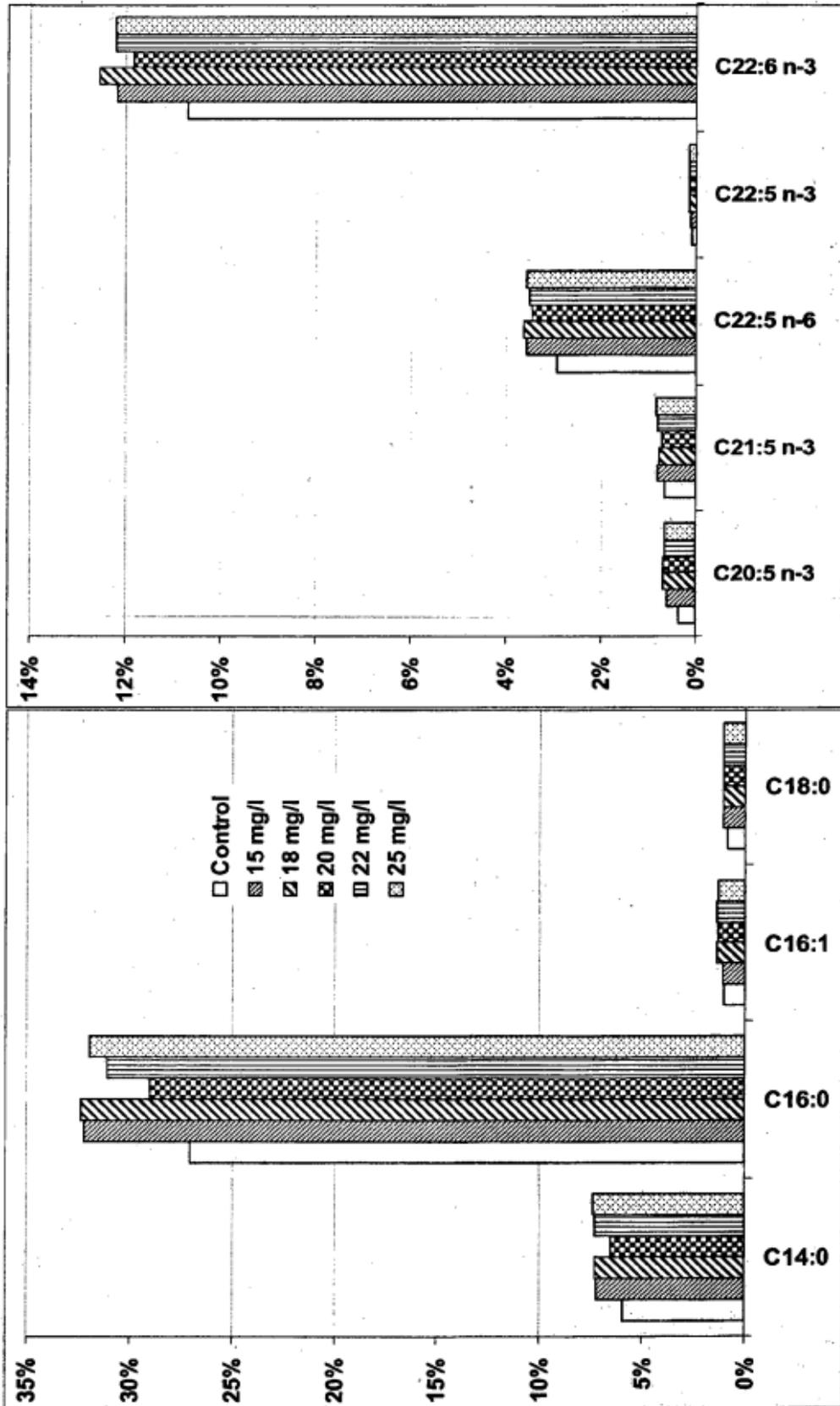
indicada la cantidad en mg/g de cada ácido graso  
identificado a través de análisis de GC FAME  
indica el % del contenido total de ácido graso para  
cada ácido graso representado

Antagonista	[C24:0]	% de TFA	[C22:6w3]	% de TFA	[C24:1w3]	% de TFA	[C23:0]	% de TFA
Control	0,00	0,00	149,96	13,64	0,00	0,00	1,98	0,27
Setoxidim (100 µM)	0,00	0,00	103,00	19,31	0,00	0,00	1,06	0,20
Control	0,00	0,00	107,04	19,88	0,00	0,00	0,88	0,16
Cenulena (20 mg/l)	0,00	0,00	118,32	19,97	0,00	0,00	1,34	0,23
Ácido oleico (2 g/l)	0,00	0,00	50,42	33,16	0,00	0,00	0,00	0,00
Ácido oleico (2 g/l) Glucosa (5 g/l)	0,00	0,00	49,78	24,65	0,00	0,00	0,00	0,00
Control	0,00	0,00	69,48	18,77	0,00	0,00	0,00	0,00
Control	0,00	0,00	60,99	16,86	0,00	0,00	0,00	0,00
Capsaicina (0,1 g/l)	0,48	0,09	117,55	21,48	0,00	0,00	0,00	0,00
Control	0,07	0,03	46,12	23,03	0,36	0,18	0,00	0,00
Ácido toluico (0,2 g/l)	0,26	0,07	103,28	28,48	0,11	0,03	0,00	0,00
Control	0,00	0,00	98,85	20,61	0,00	0,00	0,00	0,00
Norfurazón (0,2 g/l)	0,44	0,09	71,90	14,13	0,00	0,00	0,00	0,00
Control								









### REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

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

#### Documentos de patentes citados en la descripción

- JP 11075884 A [0042]
- EP 1818410 A1 [0044]
- US 5130242 A, Barclay [0053]
- US 6451567 B, Barclay [0055]
- US 6582941 B, Yokochi [0056]
- US 6607900 B, Bailey [0057]
- US 20040161831 A, Komazawa [0058]
- US 5171680 A [0142]
- EP 45665 A [0223]
- US 4897355 A [0232]
- US 20030193102 A [0252]
- WO 2004041251 A1 [0252]
- US 3610795 A [0256]
- US 0774722 W [0374]
- US 60821084 B [0374]

#### Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- BURJA, A.M. et al. Isolation and characterization of polyunsaturated fatty acid producing *Thraustochytrium* species: screening of strains and optimization of omega-3 production. *APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*, 20 April 2006, vol. 72 (6), 1161-1169 [0043]
- SHIRASAKA et al. *Mycoscience*, 2005, vol. 46, 358-363 [0062]
- *Cochrane Database Syst Rev.*, vol. 3 [0064]
- *Drugs*, vol. 63, 845-53 [0064]
- *Ann Allergy Asthma Immunol.*, vol. 90, 371-7 [0064]
- *Prev Cardiol.*, vol. 6, 38-1 [0064]
- *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, vol. 63, 351-62 [0064]
- *Am J Clin Nutr.*, vol. 77, 532-43 [0064]
- *J Neural Transm.*, vol. 64, 105-17 [0064]
- *Can J Psychiatry.*, vol. 48, 195-203 [0064]
- *Eur J Pediatr.*, vol. 162, 122-8 [0064]
- *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, vol. 68, 219-24 [0064]
- GOODWIN. *The Biochemistry of Carotenoids*. Chapman and Hall, 1980 [0078]
- *Carotenoids: A Global Strategic Business Report*, 2006 [0078]
- EDGE. *B-Biology*, 1997, vol. 4 (41), 189-200 [0079]
- SINGH. *Oncology-New York*, 1998, vol. 12, 1643 [0079]
- SMITH. *British Journal of Biomedical Science*, 1998, vol. 55, 268-275 [0079]
- BASU. *JAOCs*, 2001, vol. 78 (7), 665-675 [0079]
- MARES-PERLMAN et al. *J Nutr.*, 2002, vol. 132 (3), 518S-524S [0079]
- SCHAGERL ; MULLER. *J Plant Physiol.*, 2005 [0080]
- ARMSTRONG ; HEARST. *Faseb J.*, 1996, vol. 10 (2), 228-3 [0080]
- ARMSTRONG. *Annu Rev Microbiol.*, 1997, vol. 51, 629-59 [0080]
- CAROTENOIDS. *A Global Strategic Business Report*, 2006 [0080]
- TIAN ; DELLAPENNA. *Arch Biochem Biophys.*, 2004, vol. 430 (1), 22-9 [0081]
- TAO et al. *Metab Eng.*, 2006 [0081]
- SMITH ; WATERMAN. *Adv. Appl. Math.*, 1981, vol. 2, 482 [0094] [0218]
- NEEDLEMAN ; WUNSCH. *J. Mol. Biol.*, 1970, vol. 48, 443 [0094] [0218]
- PEARSON ; LIPMAN. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 2444 [0094] [0218]
- Wisconsin Genetics Software Package. Science Dr. Genetics Computer Group, vol. 575 [0094] [0218]
- ZUKER, M. *Science*, 1989, vol. 244, 48-52 [0095] [0219]
- JAEGER et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 7706-7710 [0095] [0219]
- JAEGER et al. *Methods Enzymol.*, 1989, vol. 183, 281-306 [0095] [0219]
- SAMBROOK et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989 [0098]
- KUNKEL et al. *Methods Enzymol.*, 1987, vol. 154, 367 [0098]
- METZ et al. *Science*, 2001, vol. 293, 290-3 [0112]
- KAULMANN ; HERTWECK. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2002, vol. 41, 1866-9 [0112]
- JOSEPH J ; PIGANATIELLS JR. *IIE Trans.*, 1998, vol. 20, 247-254 [0114] [0325]
- The Antioxidants - The Nutrients that Guard Your Body. RICHARD A. PASSWATER. Ph. D. Keats Publishing Inc, 1985 [0142]
- KUMAR et al. *Pharmac. Ther.*, 1988, vol. 39, 301 [0142]
- MACHLIN L. J. ; BENDICH. *FASEB Journal*, 1987, vol. 1, 441-445 [0142]
- LETSINGER et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 6553-6556 [0193]

- PASTAN et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1988, vol. 85, 4486 [0200]
- MILLER et al. *Mol. Cell. Biol.*, 1986, vol. 6, 2895 [0200]
- 5 • MITANI et al. *Hum. Gene Ther.*, 1994, vol. 5, 941-948 [0200]
- GOODMAN et al. *Blood*, 1994, vol. 84, 1492-1500 [0200]
- 10 • NAIDINI et al. *Science*, 1996, vol. 272, 263-267 [0200]
- AGRAWAL et al. *Exper. Hematol.*, 1996, vol. 24, 738-747 [0200]
- 15 • SCHWARTZENBERGER et al. *Blood*, 1996, vol. 87, 472-478 [0200]
- FIERS et al. *Nature*, 1978, vol. 273, 113 [0203]
- GREENWAY, P.J. et al. *Gene*, 1982, vol. 18, 355-360 [0203]
- 20 • LAIMINS, L. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1981, vol. 78, 993 [0204]
- LUSKY, M.L. et al. *Mol. Cell Bio.*, 1983, vol. 3, 1108 [0204]
- BANERJI, J.L. et al. *Cell*, 1983, vol. 33, 729 [0204]
- 25 • OSBORNE, T.F. et al. *Mol. Cell Bio.*, 1984, vol. 4, 1293 [0204]
- SOUTHERN P. ; BERG, P. *J. Molec. Appl. Genet.*, 1982, vol. 1, 327 [0211]
- 30 • MULLIGAN, R.C. ; BERG, P. *Science*, 1980, vol. 209, 1422 [0211]
- SUGDEN, B. et al. *Mol. Cell. Biol.*, 1985, vol. 5, 410-413 [0211]
- 35 • T.E. CREIGHTON. *Proteins: Structure and Molecular Properties*. W. H. Freeman & Co, 1983, 79-86 [0216]
- THORSON et al. *Methods in Mol. Biol.*, 1991, vol. 77, 43-73 [0222]
- ZOLLER. *Curr. Opin. Biotech.*, 1992, vol. 3, 348-354 [0222]
- 40 • IBBA. *Biotechnol. Genet. Eng.*, 1995, vol. 13, 197-216 [0222]
- CAHILL et al. *Trends Biochem. Sci.*, 1989, vol. 14, 400-403 [0222]
- 45 • BENNER. *Trends. Biotechnol.*, 1994, vol. 12, 158-163 [0222]
- SPATOLA, A. F. *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins*. Marcel Dekker, 1983, 267 [0223]
- 50 • SPATOLA, A. F. *Peptide Backbone Modifications. Vega Data*, March 1983, vol. 1 (3 [0223]
- MORLEY. *Trends Pharm. Sci.*, 1980, 463-468 [0223]
- 55 • HUDSON, D. et al. *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 1979, vol. 14, 177-185 [0223]
- SPATOLA et al. *Life Sci.*, 1986, vol. 38, 1243-1249 [0223]
- HANN. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1982, vol. I, 307-314 [0223]
- 60 • ALMQUIST et al. *J. Med. Chem.*, 1980, vol. 23, 1392-1398 [0223]
- JENNINGS-WHITE et al. *Tetrahedron Lett.*, 1982, vol. 23, 2533 [0223]
- HOLLADAY et al. *Tetrahedron Lett.*, 1983, vol. 24, 4401-4404 [0223]
- HRUBY. *Life Sci.*, 1982, vol. 31, 189-199 [0223]
- RIZO ; GIERASCH. *Ann. Rev. Biochem.*, 1992, vol. 61, 387 [0225]
- *Methods in Cell Biology*. Academic Press, 1976, vol. XIV, 33 [0231]
- BRIGHAM et al. *Am J Resp Cell Mol Biol*, 1989, vol. 1, 95-100 [0232]
- FELGNER et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, vol. 84, 7413-7 [0232]
- SENTER et al. *Bioconjugate Chem.*, 1991, vol. 2, 447-451 [0257]
- BAGSHAWE, K.D. *Br. J. Cancer*, 1989, vol. 60, 275-281 [0257]
- BAGSHAWE et al. *Br. J. Cancer*, 1988, vol. 58, 700-703 [0257]
- SENTER et al. *Bioconjugate Chem.*, 1993, vol. 4, 3-9 [0257]
- BATTELLI et al. *Cancer Immunol. Immunother.*, 1992, vol. 35, 421-425 [0257]
- PIETERSZ ; MCKENZIE. *Immunolog. Reviews*, 1992, vol. 129, 57-80 [0257]
- ROFFLER et al. *Biochem. Pharmacol.*, 1991, vol. 42, 2062-2065 [0257]
- HUGHES et al. *Cancer Research*, 1989, vol. 49, 6214-6220 [0257]
- LITZINGER ; HUANG. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1992, vol. 1104, 179-187 [0257]
- BROWN ; GREENE. *DNA and Cell Biology*, 1991, vol. 10, 399-409 [0257]
- REMINGTON. *The Science and Practice of Pharmacy*. Mack Publishing Company, 1995 [0259]
- *Handbook of Monoclonal Antibodies*. Noges Publications, 1985, 303-357 [0267]
- SMITH et al. *Antibodies in Human Diagnosis and Therapy*. Raven Press, 1977, 365-389 [0267]
- SENTER et al. *Bioconjugate Chem*, 1991, vol. 2, 447-51 [0268]
- BAGSHAWE. *Br J Cancer*, 1989, vol. 60, 275-81 [0268]
- BAGSHAWE et al. *Br J Cancer*, 1988, vol. 58, 700-3 [0268]
- SENTER et al. *Bioconjugate Chem*, 1993, vol. 4, 3-9 [0268]
- BATTELLI et al. *Cancer Immunol Immunother*, 1992, vol. 35, 421-5 [0268]
- PIETERSZ ; MCKENZIE. *Immunolog Reviews*, 1992, vol. 129, 57-80 [0268]
- ROFFLER et al. *Biochem Pharmacol*, 1991, vol. 42, 2062-5 [0268]
- SAMBROOK et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0277]
- IKUTA et al. *Ann. Rev. Biochem.*, 1984, vol. 53, 323-356 [0277]
- NARANG et al. *Methods Enzymol.*, 1980, vol. 65, 610-620 [0277]

- **NIELSEN et al.** *Bioconjug. Chem.*, 1994, vol. 5, 3-7 [0277]
- **GRANT GA.** *Synthetic Peptides: A User Guide.* W.H. Freeman and Co, 1992 [0278]
- 5 • Principles of Peptide Synthesis. Springer-Verlag Inc, 1993 [0278]
- **ABRAHMSSEN L et al.** *Biochemistry*, 1991, vol. 30, 4151 [0279]
- **DAWSON et al.** *Science*, 1994, vol. 266, 776-779 [0279]
- 10 • **BAGGIOLINI M et al.** *FEBS Lett.*, 1992, vol. 307, 97-101 [0279]
- **CLARK-LEWIS I et al.** *J. Biol. Chem*, 1994, vol. 269, 16075 [0279]
- 15 • **CLARK-LEWIS I et al.** *Biochemistry*, 1991, vol. 30, 3128 [0279]
- **RAJARATHNAM K et al.** *Biochemistry*, 1994, vol. 33, 6623-30 [0279]
- 20 • **SCHNOLZER, M et al.** *Science*, 1992, vol. 256, 221 [0280]
- **DE LISLE MILTON RC et al.** *Techniques in Protein Chemistry.* Academic Press, 1992, vol. IV, 257-267 [0280]
- 25 • **BLIGH ; DYER.** *Can J. Biochem. Physiol.*, 1959, vol. 37, 912-917 [0341]
- **LEWIS et al.** *J. Microbiol. Methods*, 2000, vol. 43, 107-116 [0341]
- 30 • **CARTENS et al.** *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1996, vol. 73, 1025-1031 [0341]
- **PINKART et al.** *J. Microbiol. Methods*, 1998, vol. 34, 9-15 [0341]
- 35 • **BATEMAN ; JENKINS.** *J. Agric. Food Chem.*, 1997, vol. 45, 132-135 [0341]
- **BREMER.** *Marine Mycology - A Practical Approach.* Fungal Diversity Press, 2000, 49-61 [0343]
- **BOWLES et al.** *J Biotechnol*, 1999, vol. 70, 193-202 [0344] [0351] [0361]
- 40 • **LEWIS et al.** *J Microbiol Meth.*, 2000, vol. 43, 107-116 [0345]
- **HONDA et al.** *J Eukaryot Microbiol.*, 1999, vol. 46, 637-647 [0347]
- **MO et al.** *Mar Biol*, 2002, vol. 140, 883-889 [0347]
- **BENSON et al.** *Nucleic Acids Res*, 2005, vol. 33, 34-38 [0347]
- **SAITO ; NEI.** *Mol Biol Evol*, 1987, vol. 4, 406-425 [0347]
- **FELSENSTEIN.** *Evolution*, 1985, vol. 39, 783-791 [0347]
- **LEWIS et al.** *J Microbiol Meth*, 2000, vol. 43, 107-116 [0350]
- **HUANG et al.** *Mar Biotechnol*, 2003, vol. 5, 450-457 [0351] [0352] [0353] [0356] [0361]
- **BARCLAY et al.** *J Appl Phycol*, 1994, vol. 6, 123-129 [0351]
- **YOKOCHI et al.** *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, vol. 49, 72-76 [0351] [0358]
- **LEANDER ; PORTER.** *Mycologia*, 2001, vol. 93, 459-464 [0353]
- **CARMONA et al.** *Biosci Biotechnol Biochem*, 2003, vol. 67, 884-888 [0353]
- **NAKAHARA et al.** *JAm Oil Chem Soc*, 1996, vol. 73, 1421-1426 [0354]
- **ELLENBOGEN et al.** *Comp Biochem Physiol*, 1969, vol. 29, 805-81 [0354]
- **ILDA et al.** *J Ferment Bioeng*, 1996, vol. 81, 76-78 [0355] [0357] [0358]
- **NAKAHARA et al.** *J Am Oil Chem Soc*, 1996, vol. 73, 1421-1426 [0355]
- **VALADON.** *Trans Br Mycol Soc*, 1976, vol. 67, 1-15 [0356]
- **CARMONA et al.** *Biosci Biotechnol Biochem*, 2003, vol. 67, 884-888 [0356]
- **SIJTSMA et al.** *Recent Res Devel Microbiol*, 1998, vol. 2, 219-232 [0357]
- **BAJPAI et al.** *J Am Oil Chem Soc*, 1991, vol. 68, 509-514 [0358] [0360]
- **LI ; WARD.** *J Ind Microbiol*, 1994, vol. 13, 238-241 [0358]
- **AKI et al.** *J Am Oil Chem Soc*, 2003, vol. 80, 789-794 [0358]