

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 384**

51 Int. Cl.:

C12P 7/64 (2006.01)

C12N 1/14 (2006.01)

C12N 1/16 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

C12R 1/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2011 E 11754172 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2016 EP 2545159**

54 Título: **Cepas de levadura y sus usos en la producción de lípidos**

30 Prioridad:

22.02.2011 US 445469 P
11.03.2010 US 313055 P

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

14.10.2016

73 Titular/es:

DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)
Het Overloon 1
6411 TE Heerlen, NL

72 Inventor/es:

APT, KIRK, E.;
BARCLAY, WILLIAM, R. y
BEHRENS, PAUL, WARREN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 586 384 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

Cepas de levadura y sus usos en la producción de lípidos

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 La invención se refiere a microorganismos aislados, así como a biomásas, cultivos, aceites microbianos, y composiciones de los mismos. La invención también proporciona métodos de producción de los aceites microbianos y métodos de uso de los microorganismos aislados, biomásas, cultivos y aceites microbianos.

Técnica anterior

15 Los ácidos grasos se clasifican basándose en la longitud y en las características de saturación de la cadena de carbono. Los ácidos grasos se denominan ácidos grasos saturados cuando entre los átomos de carbono no hay dobles enlaces y se denominan ácidos grasos insaturados cuando si hay dobles enlaces. Los ácidos grasos insaturados de cadena larga son monoinsaturados cuando solo hay un doble enlace y son poliinsaturados cuando hay más de un doble enlace.

20 Los ácidos grasos poliinsaturados ("PUFA") se clasifican basándose en la posición del primer doble enlace del extremo metilo del ácido graso: los ácidos grasos omega-3 (n-3) contienen un primer doble enlace en el tercer carbono, mientras que los ácidos grasos omega-6 (n-6) contienen un primer doble enlace en el sexto carbono. Por ejemplo, el ácido docosahexaenoico ("DHA") es un ácido graso poliinsaturado omega-3 de cadena larga ("LC-PUFA") con una longitud de cadena de 22 carbonos y 6 dobles enlaces, frecuentemente denominado "22:6 n-3". Otros LC-PUFA omega-3 incluyen ácido eicosapentaenoico ("EPA"), denominado "20:5 n-3", y ácido docosapentaenoico omega-3 ("DPA n-3"), denominado "22:5 n-3." DHA y EPA se han denominado ácidos grasos "esenciales". Los LC-PUFA omega-6 incluyen ácido araquidónico ("ARA"), denominado "20:4 n-6", y ácido docosapentaenoico omega-6 ("DPA n-6"), denominado "22:5 n-6."

30 La producción de aceites biológicos a partir de fuentes, tales como, plantas (incluyendo semillas de aceite), microorganismos y animales, es esencial para diversos fines. Por ejemplo, se desea aumentar la ingesta alimentaria de muchos nutrientes beneficiosos encontrados en aceites biológicos. Nutrientes particularmente beneficiosos incluyen ácidos grasos tales como ácidos grasos omega-3 y omega-6 y ésteres de los mismos. Los ácidos grasos omega-3 son reconocidos como importantes compuestos de la dieta para prevenir la arteriosclerosis y la enfermedad cardíaca coronaria, para aliviar afecciones inflamatorias y para retrasar el crecimiento de células tumorales. Los ácidos grasos omega-6 sirven, no solo como lípidos estructurales en el cuerpo humano, sino también como precursores de varios factores en la inflamación, tales como prostaglandinas, leucotrienos y oxilipinas.

40 Debido a que los seres humanos y muchos otros animales no pueden sintetizar directamente los ácidos grasos esenciales omega-3 y omega-6, deben obtenerse en la dieta. Fuentes dietéticas tradicionales de ácidos grasos esenciales incluyen aceites vegetales, aceites de animales marinos, aceites de pescado y semillas de aceite. Además, se ha encontrado que los aceites producidos por ciertos microorganismos son ricos en ácidos grasos esenciales.

45 El ácido oleico es otro ácido graso beneficioso importante. El ácido oleico es un ácido graso omega-9 que se ha asociado a beneficios para la salud tales como el ralentizamiento del desarrollo de enfermedades cardíacas y la promoción de la producción de antioxidantes. También se usa como componente en el aceite de Lorenzo, una medicación desarrollada para prevenir la aparición de adrenoleucodistrofia (ALD). El ácido oleico también se ha usado como componente cosmético debido a su efecto hidratante.

50 El ácido linoleico también es un ejemplo de un ácido graso importante. Es un ácido graso omega-6 insaturado que es esencial para diversos procesos biológicos, tales como aquellos desarrollados en la pérdida de pelo, cicatrización, fibrosis quística, dermatitis y diabetes. El ácido linoleico también se usa como componente cosmético debido a sus efectos beneficiosos sobre la piel, y en la fabricación de jabones y emulsionantes.

Del documento WO97/37032 se conoce un ácido graso poliinsaturado (PUFA) microbiano que contiene aceite con alto contenido de triglicéridos y una alta estabilidad oxidativa. Los aceites se aíslan de *Mortierella* y otras microalgas.

60 El documento US2004/0161831 desvela microorganismos que tienen la capacidad de producir ácido docosahexaenoico. El organismo es un *Thraustochytrium*.

65 De Pathan A. et al., Curr. Microbiol. (2010) (publicado en diciembre de 2009), vol. 60, no. 4, páginas 307-314, se conoce la caracterización de 132 cepas de levadura de cuatro muestras de sedimentos recogidas de charcos pequeños en la proximidad del glaciar Midre Lovenbreen, Ártico. En la Tabla 3 se dan datos de la composición de ácidos grasos para algunas cepas de *Rhodotorula*.

Con el fin de reducir los costes asociados a la producción de ácidos grasos beneficiosos para usos dietéticos, farmacéuticos y cosméticos, existe una necesidad de un método de bajo coste y eficaz de producción de aceites biológicos que contienen estos ácidos grasos.

5 Breve resumen de la invención

La presente invención se refiere a un microorganismo aislado seleccionado de la lista que incluye el microorganismo depositado con el N.º de acceso de ATCC PTA-11615, el microorganismo depositado con el N.º de acceso de ATCC PTA-11616 y el microorganismo depositado con el N.º de acceso de ATCC PTA-11617. La invención se refiere adicionalmente a un método de producción de un aceite microbiano, que comprende: cultivar los microorganismos aislados depositados anteriores, o un microorganismo aislado que es de la especie *Sporidiobolus pararoseus*, en el que el microorganismo es capaz de producir un aceite microbiano que comprende menos del 30 % en peso de ácidos grasos saturados, o mezclas de los mismos, en un cultivo para producir un aceite microbiano y extraer el aceite microbiano.

En algunas realizaciones, los microorganismos aislados son capaces de producir ácidos grasos en una cantidad que es al menos 30 % en peso del peso de las células secas. En algunas realizaciones, los microorganismos aislados son capaces de producir ácidos grasos en una cantidad que es al menos el 40 %, al menos el 50 %, o al menos el 60 % en peso del peso de las células secas.

En algunas realizaciones, los microorganismos aislados de la invención son capaces de producir un aceite microbiano que comprende más del 30 % en peso, más del 40 % en peso, más del 50 % en peso, o más del 60 % en peso de ácido oleico.

En algunas realizaciones, los microorganismos aislados de la invención son capaces de producir un aceite microbiano que comprende más del 5 % en peso, más del 10 % en peso, o más del 15 % en peso de ácido linoleico.

En algunas realizaciones, los microorganismos aislados de la invención son capaces de producir un aceite microbiano que comprende menos del 25 % en peso de ácidos grasos saturados.

En algunas realizaciones, los microorganismos de la invención son capaces de producir un aceite microbiano que comprende menos del 25 % en peso, menos del 20 % en peso, o menos del 15 % en peso de ácido palmítico.

En algunas realizaciones, los microorganismos aislados de la invención son capaces de producir un aceite microbiano que comprende menos del 10 % en peso, o menos del 5 % en peso de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga de 20 o más de longitud de cadena de carbono.

La presente invención se refiere adicionalmente a un microorganismo aislado de la especie *Sporidiobolus pararoseus*, en la que el microorganismo es capaz de producir ácidos grasos en una cantidad que es al menos el 50 % en peso del peso de las células secas.

En algunas realizaciones, los microorganismos aislados de la especie *Sporidiobolus pararoseus* son capaces de producir ácidos grasos en una cantidad que es al menos el 55 % o al menos el 60 % en peso del peso de las células secas.

La presente invención se refiere a un microorganismo aislado de la especie seleccionada del grupo que consiste en *Sporidiobolus pararoseus*, en la que el microorganismo es capaz de producir un aceite microbiano que comprende 0,5 % al 30 % en peso de ácidos grasos saturados, y en la que el microorganismo es capaz de producir ácidos grasos en una cantidad que es 30 % al 80 % en peso del peso de las células secas.

La presente invención también se refiere a un microorganismo aislado de la especie seleccionada del grupo que consiste en *Sporidiobolus pararoseus*, en la que el microorganismo es capaz de producir un aceite microbiano que comprende 30 % al 70 % en peso de ácido oleico y 5 % al 30 % en peso de ácido linoleico.

La presente invención se refiere adicionalmente a un microorganismo aislado de la especie *Sporidiobolus pararoseus*, en la que el microorganismo es capaz de producir ácidos grasos en una cantidad que es 50 % al 80 % en peso del peso de las células secas, y en la que el microorganismo es capaz de producir un aceite microbiano que comprende 5 % al 30 % en peso de ácido linoleico.

La presente invención se refiere a un microorganismo aislado depositado con el N.º de acceso de ATCC PTA-11615, un microorganismo aislado depositado con el N.º de acceso de ATCC PTA-11616, y un microorganismo aislado depositado con el N.º de acceso de ATCC PTA-11617.

La presente invención también se refiere a un microorganismo aislado que tiene las características del microorganismo depositado con el N.º de acceso de ATCC PTA-11615, un microorganismo aislado que tiene las características del microorganismo depositado con el N.º de acceso de ATCC PTA-11616, y un microorganismo

aislado que tiene las características del microorganismo depositado con el N.º de acceso de ATCC PTA-11617.

La presente invención se refiere a una biomasa aislada que comprende un microorganismo aislado de la invención o mezclas de los microorganismos aislados de la invención.

5 En algunas realizaciones, al menos el 30 % en peso del peso de las células secas de la biomasa aislada son ácidos grasos.

10 La presente invención también se refiere a un cultivo que comprende un microorganismo aislado de la invención o mezclas de los microorganismos aislados de la invención.

En algunas realizaciones, el cultivo comprende al menos 5 g/l de biomasa del microorganismo aislado.

15 La presente invención se refiere a un método de producción de un aceite microbiano, que comprende: cultivar un microorganismo aislado de la invención o mezclas de microorganismos aislados de la invención en un cultivo para producir un aceite microbiano.

En algunas realizaciones, el método comprende además extraer el aceite microbiano.

20 En algunas realizaciones, los microorganismos aislados se cultivan en presencia de una fuente de carbono seleccionada del grupo que consiste en sacarosa, glucosa, fructosa, xilosa, glicerol, manosa, arabinosa, lactosa, galactosa, maltosa, celulosa, lignocelulosa, y combinaciones de las mismas.

25 En algunas realizaciones, el método produce un cultivo que comprende biomasa del microorganismo aislado, y el cultivo comprende al menos 5 g/l de la biomasa.

La presente invención se refiere adicionalmente a aceites microbianos producidos por los métodos de la invención, y al uso del microorganismo aislado, biomasa, cultivo o aceite microbiano de la invención para la fabricación de un alimento, suplemento, cosmético, o composición farmacéutica para un animal no humano o humano.

30 Breve descripción de los dibujos/figuras

La Figura 1 muestra las secuencias de ADN de la cepa 28428 (N.º de acceso de ATCC PTA-11615).

35 La Figura 2 muestra el árbol filogenético de las secuencias de ADN de D1/D2 de la cepa 28428 (N.º de acceso de ATCC PTA-11615).

La Figura 3 muestra el árbol filogenético de las secuencias de ADN de ITS de la cepa 28428 (N.º de acceso de ATCC PTA-11615).

La Figura 4 muestra las secuencias de ADN de la cepa 29404 (N.º de acceso de ATCC PTA-11616).

40 La Figura 5 muestra el árbol filogenético de las secuencias de ADN de D1/D2 de la cepa 29404 (N.º de acceso de ATCC PTA-11616).

La Figura 6 muestra el árbol filogenético de las secuencias de ADN de ITS de la cepa 29404 (N.º de acceso de ATCC PTA-11616).

La Figura 7 muestra las secuencias de ADN de la cepa 29794 (N.º de acceso de ATCC PTA-11617).

45 La Figura 8 muestra el árbol filogenético de las secuencias de ADN de D1/D2 de la cepa 29794 (N.º de acceso de ATCC PTA-11617).

La Figura 9 muestra el árbol filogenético de las secuencias de ADN de ITS de la cepa 29794 (N.º de acceso de ATCC PTA-11617).

50 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a microorganismo aislado de las especies *Pseudozyma aphidis*, *Pseudozyma ruginosa*, *Sporidiobolus pararoseus* o *Rhodotorula ingeniosa*, además de a microorganismos que tienen las características de los microorganismos aislados, y biomasas, aceites microbianos, composiciones y cultivos de los mismos. La presente invención también se refiere a métodos de producción de aceites microbianos a partir de los microorganismos aislados de la invención, y a métodos de uso de los microorganismos aislados, biomasas, cultivos y aceites microbianos. El microorganismo aislado en el presente documento se describe altamente productivo en comparación con cepas aisladas anteriores y produce perfiles de ácidos grasos únicos, caracterizados en parte por altos niveles de ácidos grasos insaturados de cadena corta, bajos niveles de ácidos grasos saturados y bajos niveles de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga.

60 En algunas realizaciones, los microorganismos aislados de la invención son capaces de producir ácidos grasos en una cantidad que es al menos el 30 % en peso del peso de las células secas. En algunas realizaciones, los microorganismos aislados de la invención son capaces de producir ácidos grasos en una cantidad que es al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, o al menos el 65 % en peso del peso de las células secas. En algunas realizaciones, los microorganismos aislados de la invención son capaces de producir ácidos grasos en una cantidad que es 30 % al 80 % en peso del peso de las células secas,

35 % al 80 % en peso del peso de las células secas, 40 % al 80 % en peso del peso de las células secas, 45 % al 75 % en peso del peso de las células secas, 50 % al 75 % en peso del peso de las células secas, 55 % al 70 % en peso del peso de las células secas, o 60 % al 70 % en peso del peso de las células secas.

5 En algunas realizaciones, la invención se refiere a un microorganismo aislado de las especies *Pseudozyma aphidis*, *Pseudozyma rugulosa* o *Rhodotorula ingeniosa*, en la que el microorganismo es capaz de producir ácidos grasos en una cantidad que es al menos el 30 % en peso del peso de las células secas. En alguna realización, los microorganismos aislados de las especies *Pseudozyma aphidis*, *Pseudozyma rugulosa* o *Rhodotorula ingeniosa* son capaces de producir ácidos grasos en una cantidad que es al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al
10 menos el 50 %, o al menos el 55 % en peso del peso de las células secas. En algunas realizaciones, los microorganismos aislados de las especies *Pseudozyma aphidis*, *Pseudozyma rugulosa* o *Rhodotorula ingeniosa* son capaces de producir ácidos grasos en una cantidad que es 30 % al 80 % en peso del peso de las células secas, 35 % al 75 % en peso del peso de las células secas, 40 % al 70 % en peso del peso de las células secas, 45 % al 70 % en peso del peso de las células secas, 50 % al 65 % en peso del peso de las células secas, o 55 % al 65 % en
15 peso del peso de las células secas.

La presente invención también se refiere a un microorganismo aislado de la especie *Sporidiobolus pararoseus*, en la que el microorganismo es capaz de producir ácidos grasos en una cantidad que es mayor del 45 % en peso del peso de las células secas. En algunas realizaciones, los microorganismos aislados de la especie *Sporidiobolus*
20 *pararoseus* son capaces de producir ácidos grasos en una cantidad que es al menos el 46 %, al menos el 47 %, al menos el 48 %, al menos el 49 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, o al menos el 70 % en peso del peso de las células secas. En algunas realizaciones, los microorganismos aislados de la especie *Sporidiobolus pararoseus* son capaces de producir ácidos grasos en una cantidad que es 30 % al 85 % en peso del peso de las células secas, 40 % al 80 % en peso del peso de las células secas, 45 % al 80 % en peso del peso de las células secas, 46 % al 80 % en peso del peso de las células secas, 47 % al 80 % en peso del peso de las células secas, 48 % al 80 % en peso del peso de las células secas, 49 % al 80 % en peso del peso de las células secas, 50 % al 80 % en peso del peso de las células secas, 55 % al 75 % en peso del peso de las células secas, 60 % al 70 % en peso del peso de las células secas, o 65 % al 70 % en peso del peso de las células secas.

30 En algunas realizaciones, la invención se refiere a un microorganismo aislado de las especies *Pseudozyma aphidis*, *Pseudozyma rugulosa*, *Sporidiobolus pararoseus* o *Rhodotorula ingeniosa*, en la que el microorganismo es capaz de producir un aceite microbiano que comprende más del 30 % en peso de ácido oleico (18:1 n-9). En algunas realizaciones, el microorganismo aislado de la invención es capaz de producir un aceite microbiano que comprende más del 35 %, más del 40 %, más del 45 %, más del 50 %, más del 55 %, más del 60 %, o más del 65 % en peso de ácidos oleicos. En algunas realizaciones, el microorganismo aislado de la invención es capaz de producir un aceite microbiano que comprende del 30 % al 70 % en peso de ácido oleico, del 35 % al 70 % en peso de ácido oleico, del 40 % al 65 % en peso de ácido oleico, del 45 % al 65 % en peso de ácido oleico, del 50 % al 65 % en peso de ácido oleico, del 55 % al 65 % en peso de ácido oleico, o del 60 % al 65 % en peso de ácidos oleicos.

40 En algunas realizaciones, el microorganismo aislado de la invención es capaz de producir un aceite microbiano que comprende más del 5 % en peso de ácido linoleico (18:2). En algunas realizaciones, el microorganismo aislado de la invención es capaz de producir un aceite microbiano que comprende más del 7 %, más del 10 %, más del 12 %, más del 15 %, más del 17 %, o más del 20 % en peso de ácido linoleico. En algunas realizaciones, el microorganismo aislado de la invención es capaz de producir un aceite microbiano que comprende del 5 % al 30 %
45 en peso de ácido linoleico, del 7 % al 28 % en peso de ácido linoleico, del 10 % al 25 % en peso de ácido linoleico, del 12 % al 25 % en peso de ácido linoleico, del 15 % al 25 % en peso de ácido linoleico, del 17 % al 25 % en peso de ácido linoleico, o del 20 % al 23 % en peso de ácido linoleico.

En algunas realizaciones, el microorganismo aislado de la invención es capaz de producir un aceite microbiano que comprende menos del 30 % en peso de ácidos grasos saturados. En algunas realizaciones, el microorganismo aislado de la invención es capaz de producir un aceite microbiano que comprende menos del 25 %, menos del 20 %, menos del 15 %, menos del 10 %, menos del 8 %, o menos del 5 % en peso de ácidos grasos saturados. En algunas realizaciones, el microorganismo aislado de la invención es capaz de producir un aceite microbiano que comprende del 0,5 % al 30 % en peso de ácidos grasos saturados, del 1 % al 25 % en peso de ácidos grasos saturados, del 1 % al 20 % en peso de ácidos grasos saturados, del 1 % al 15 % en peso de ácidos grasos saturados, del 1 % al 10 % en peso de ácidos grasos saturados, del 1 % al 8 % en peso de ácidos grasos saturados, o del 1 % al 5 % en peso de ácido graso saturado.
55

En algunas realizaciones, el microorganismo aislado de la invención es capaz de producir un aceite microbiano que comprende menos del 25 % en peso de ácido palmítico (16:0). En algunas realizaciones, el microorganismo aislado de la invención es capaz de producir un aceite microbiano que comprende menos del 23 %, menos del 20 %, menos del 18 %, o menos del 15 % en peso de ácido palmítico. En algunas realizaciones, el microorganismo aislado de la invención es capaz de producir un aceite microbiano que comprende del 0,5 % al 25 % en peso de ácido palmítico, del 1 % al 20 % en peso de ácido palmítico, del 1 % al 18 % en peso de ácido palmítico, del 1 % al 15 % en peso de ácido palmítico, del 5 % al 15 % en peso de ácido palmítico, o del 10 % al 15 % en peso de ácido palmítico.
60
65

En algunas realizaciones, el microorganismo aislado de la invención es capaz de producir un aceite microbiano que comprende menos del 10 % en peso de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA) de 20 o más de longitud de cadena de carbono. En algunas realizaciones, el microorganismo aislado de la invención es capaz de producir un aceite microbiano que comprende menos del 8 %, menos del 5 %, menos del 4 %, menos del 3 %, menos del 2 %, menos del 1 %, o menos del 0,5 % en peso de LCPUFA de 20 o más de longitud de cadena de carbono. En algunas realizaciones, el microorganismo aislado de la invención es capaz de producir un aceite microbiano que comprende del 0 % al 10 % en peso, del 0 % al 8 % en peso, del 0 % al 5 % en peso, del 0 % al 4 % en peso, del 0 % al 3 % en peso, del 0 % al 2 % en peso, o del 0 % al 1 % en peso de LCPUFA de 20 o más de longitud de cadena de carbono. En algunas realizaciones, el microorganismo aislado de la invención es capaz de producir un aceite microbiano sin cantidad detectable de LCPUFA de 20 o más de longitud de cadena de carbono

En algunas realizaciones, el microorganismo aislado de la invención es capaz de producir un aceite microbiano que comprende menos del 10 %, menos del 8 %, menos del 5 %, menos del 4 %, menos del 3 %, menos del 2 %, menos del 1 % o menos del 0,5 % en peso de ácido docosahexaenoico (DHA). En algunas realizaciones, el microorganismo aislado de la invención es capaz de producir un aceite microbiano que comprende del 0 % al 10 % en peso de DHA, del 0 % al 8 % en peso de DHA, del 0 % al 5 % en peso de DHA, del 0 % al 4 % en peso de DHA, del 0 % al 3 % en peso de DHA, del 0 % al 2 % en peso de DHA, o del 0 % al 1 % en peso de DHA. En algunas realizaciones, el microorganismo aislado de la invención es capaz de producir un aceite microbiano sin cantidad detectable de DHA.

En algunas realizaciones, el microorganismo aislado de la invención es capaz de producir un aceite microbiano que comprende menos del 10 %, menos del 8 %, menos del 5 %, menos del 4 %, menos del 3 %, menos del 2 %, menos del 1 %, o menos del 0,5 % en peso de ácido eicosapentaenoico (EPA). En algunas realizaciones, el microorganismo aislado de la invención es capaz de producir un aceite microbiano que comprende del 0 % al 10 % en peso de EPA, del 0 % al 8 % en peso de EPA, del 0 % al 5 % en peso de EPA, del 0 % al 4 % en peso de EPA, del 0 % al 3 % en peso de EPA, del 0 % al 2 % en peso de EPA, o del 0 % al 1 % en peso de EPA. En algunas realizaciones, el microorganismo aislado de la invención es capaz de producir un aceite microbiano sin cantidad detectable de EPA.

En algunas realizaciones, el microorganismo aislado de la invención es capaz de producir un aceite microbiano que comprende menos del 10 %, menos del 8 %, menos del 5 %, menos del 4 %, menos del 3 %, menos del 2 %, menos del 1 %, o menos del 0,5 % en peso de ácido docosapentaenoico omega-3 (DPA n-3). En algunas realizaciones, el microorganismo aislado de la invención es capaz de producir un aceite microbiano que comprende del 0 % al 10 % en peso de DPA n-3, del 0 % al 8 % en peso de DPA n-3, del 0 % al 5 % en peso de DPA n-3, del 0 % al 4 % en peso de DPA n-3, del 0 % al 3 % en peso de DPA n-3, del 0 % al 2 % en peso de DPA n-3, o del 0 % al 1 % en peso de DPA n-3. En algunas realizaciones, el microorganismo aislado de la invención es capaz de producir un aceite microbiano sin cantidad detectable de DPA n-3.

En algunas realizaciones, el microorganismo aislado de la invención es capaz de producir un aceite microbiano que comprende menos del 10 %, menos del 8 %, menos del 5 %, menos del 4 %, menos del 3 %, menos del 2 %, menos del 1 %, o menos del 0,5 % en peso de ácido docosapentaenoico omega-6 (DPA n-6). En algunas realizaciones, el microorganismo aislado de la invención es capaz de producir un aceite microbiano que comprende del 0 % al 10 % en peso de DPA n-6, del 0 % al 8 % en peso de DPA n-6, del 0 % al 5 % en peso de DPA n-6, del 0 % al 4 % en peso de DPA n-6, del 0 % al 3 % en peso de DPA n-6, del 0 % al 2 % en peso de DPA n-6, o del 0 % al 1 % en peso de DPA n-6. En alguna realización, el microorganismo aislado de la invención es capaz de producir un aceite microbiano sin cantidad detectable de DPA n-6.

En algunas realizaciones, el microorganismo aislado de la invención es capaz de producir un aceite microbiano que comprende menos del 10 %, menos del 8 %, menos del 5 %, menos del 4 %, menos del 3 %, menos del 2 %, menos del 1 %, o menos del 0,5 % en peso de ácido araquidónico omega-6 (ARA). En algunas realizaciones, el microorganismo aislado de la invención es capaz de producir un aceite microbiano que comprende del 0 % al 10 % en peso de ARA, del 0 % al 8 % en peso de ARA, del 0 % al 5 % en peso de ARA, del 0 % al 4 % en peso de ARA, del 0 % al 3 % en peso de ARA, del 0 % al 2 % en peso de ARA, o del 0 % al 1 % en peso de ARA. En algunas realizaciones, el microorganismo aislado de la invención es capaz de producir un aceite microbiano sin cantidad detectable de ARA.

En algunas realizaciones, la invención se refiere a un microorganismo aislado de las especies *Pseudozyma aphidis*, *Pseudozyma rugulosa*, *Sporidiobolus paroseus* o *Rhodotorula ingeniosa*, en la que el microorganismo es capaz de producir un aceite microbiano que comprende 0,5 % al 30 % en peso de ácidos grasos saturados, y en la que el microorganismo es capaz de producir ácidos grasos en una cantidad que es 30 % al 80 % en peso del peso de las células secas. En algunas realizaciones, el microorganismo aislado de las especies *Pseudozyma aphidis*, *Pseudozyma rugulosa*, *Sporidiobolus paroseus* o *Rhodotorula ingeniosa* es capaz de producir un aceite microbiano que comprende 1 % al 25 % en peso de ácidos grasos saturados, y es capaz de producir ácidos grasos en una cantidad que es 40 % al 80 % en peso del peso de las células secas. En algunas realizaciones, el microorganismo aislado de la especie *Pseudozyma aphidis*, *Pseudozyma rugulosa*, *Sporidiobolus paroseus* o *Rhodotorula ingeniosa* es capaz de producir un aceite microbiano que comprende 1 % al 20 % en peso de ácidos grasos saturados, y es capaz de producir ácidos grasos en una cantidad que es 50 % al 80 % en peso del peso de

las células secas En algunas realizaciones, el microorganismo aislado de la especie *Pseudozyma aphidis*, *Pseudozyma rugulosa*, *Sporidiobolus pararoseus* o *Rhodotorula ingeniosa* es capaz de producir un aceite microbiano que comprende 1 % al 20 % en peso de ácidos grasos saturados, y es capaz de producir ácidos grasos en una cantidad que es 55 % al 75 % en peso del peso de las células secas, En algunas realizaciones, el microorganismo aislado de la especie *Pseudozyma aphidis*, *Pseudozyma rugulosa*, *Sporidiobolus pararoseus* o *Rhodotorula ingeniosa* es capaz de producir un aceite microbiano que comprende 1 % al 20 % en peso de ácidos grasos saturados, y es capaz de producir ácidos grasos en una cantidad que es 60 % al 75 % en peso del peso de las células secas. En algunas realizaciones, el microorganismo aislado de la especie *Pseudozyma aphidis*, *Pseudozyma rugulosa*, *Sporidiobolus pararoseus* o *Rhodotorula ingeniosa* es capaz de producir un aceite microbiano que comprende 1 % al 20 % en peso de ácidos grasos saturados, y es capaz de producir ácidos grasos en una cantidad que es 60 % al 70 % en peso del peso de las células secas.

En algunas realizaciones, la invención se refiere a un microorganismo aislado de las especies *Pseudozyma aphidis*, *Pseudozyma rugulosa*, *Sporidiobolus pararoseus* o *Rhodotorula ingeniosa*, en la que el microorganismo es capaz de producir un aceite microbiano que comprende 30 % al 70 % en peso de ácido oleico y 5 % al 30 % en peso de ácido linoleico. En algunas realizaciones, el microorganismo aislado de las especies *Pseudozyma aphidis*, *Pseudozyma rugulosa*, *Sporidiobolus pararoseus* o *Rhodotorula ingeniosa* es capaz de producir un aceite microbiano que comprende 35 % al 70 % en peso de ácido oleico y 5 % al 25 % en peso de ácido linoleico. En algunas realizaciones, el microorganismo aislado de las especies *Pseudozyma aphidis*, *Pseudozyma rugulosa*, *Sporidiobolus pararoseus* o *Rhodotorula ingeniosa* es capaz de producir un aceite microbiano que comprende 40 % al 65 % en peso de ácido oleico y 5 % al 20 % en peso de ácido linoleico. En algunas realizaciones, el microorganismo aislado de las especies *Pseudozyma aphidis*, *Pseudozyma rugulosa*, *Sporidiobolus pararoseus* o *Rhodotorula ingeniosa* es capaz de producir un aceite microbiano que comprende 45 % al 65 % en peso de ácido oleico y 5 % al 20 % en peso de ácido linoleico. En algunas realizaciones, los microorganismos aislados de las especies *Pseudozyma aphidis*, *Pseudozyma rugulosa*, *Sporidiobolus pararoseus* o *Rhodotorula ingeniosa* es capaz de producir un aceite microbiano que comprende 50 % al 65 % en peso de ácido oleico y 7 % al 20 % en peso de ácido linoleico. En algunas realizaciones, el microorganismo aislado de las especies *Pseudozyma aphidis*, *Pseudozyma rugulosa*, *Sporidiobolus pararoseus* o *Rhodotorula ingeniosa* es capaz de producir un aceite microbiano que comprende 55 % al 65 % en peso de ácido oleico y 7 % al 15 % en peso de ácido linoleico.

En algunas realizaciones, la invención se refiere a un microorganismo aislado de la especie *Sporidiobolus pararoseus*, en la que el microorganismo es capaz de producir ácidos grasos en una cantidad que es 50 % al 80 % en peso del peso de las células secas, y en la que el microorganismo es capaz de producir un aceite microbiano que comprende 5 % al 30 % en peso de ácido linoleico. En algunas realizaciones, el microorganismo aislado de la especie *Sporidiobolus pararoseus* es capaz de producir ácidos grasos en una cantidad que es 55 % al 75 % en peso del peso de las células secas, y en la que el microorganismo es capaz de producir un aceite microbiano que comprende 5 % al 25 % en peso de ácido linoleico. En algunas realizaciones, el microorganismo aislado de la especie *Sporidiobolus pararoseus* es capaz de producir ácidos grasos en una cantidad que es 60 % al 70 % en peso del peso de las células secas, y en la que los microorganismos es capaz de producir un aceite microbiano que comprende 7 % al 20 % en peso de ácido linoleico. En algunas realizaciones, el microorganismo aislado de la especie *Sporidiobolus pararoseus* es capaz de producir ácidos grasos en una cantidad que es 65 % al 70 % en peso del peso de las células secas, y en la que el microorganismo es capaz de producir un aceite microbiano que comprende 7 % al 15 % en peso de ácido linoleico.

En algunas realizaciones, la invención se refiere a un microorganismo aislado de la especie depositada con el N.º de acceso de ATCC PTA-11615. El microorganismo aislado también se conoce en el presente documento como *Pseudozyma aphidis/rugulosa* ATCC PTA-11615. El microorganismo aislado asociado a N.º de acceso de ATCC PTA-11.615 se depositó bajo el Tratado de Budapest el 26 de enero de 2011 en la Colección Americana de Cultivos Tipo, Depósito de patente, 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209.

En algunas realizaciones, la invención se refiere a un microorganismo aislado de la especie depositada con el N.º de acceso de ATCC PTA-11616. El microorganismo aislado también se conoce en el presente documento como *Sporidiobolus pararoseus* ATCC PTA-11616. El microorganismo aislado asociado a N.º de acceso de ATCC PTA-11616 se depositó bajo el Tratado de Budapest el 26 de enero de 2011 en la Colección Americana de Cultivos Tipo, Depósito de patente, 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209.

En algunas realizaciones, la invención se refiere a un microorganismo aislado de la especie depositada con el N.º de acceso de ATCC PTA-11617. El microorganismo aislado también se conoce en el presente documento como *Rhodotorula ingeniosa* ATCC PTA-11617. El microorganismo aislado asociado a N.º de acceso de ATCC PTA-11617 se depositó bajo el Tratado de Budapest el 26 de enero de 2011 en la Colección Americana de Cultivos Tipo, Depósito de patente, 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209.

En algunas realizaciones, la invención se refiere a un microorganismo aislado que tiene las características del microorganismo depositado con el N.º de acceso de ATCC PTA-11615, N.º de acceso de ATCC PTA-11616 o N.º de acceso de ATCC PTA-11617. Las características de la especie depositada con el N.º de acceso de ATCC PTA-11615, N.º de acceso de ATCC PTA-11616 o N.º de acceso de ATCC PTA-11617 incluyen sus propiedades de

crecimiento y fenotípicas (ejemplos de propiedades fenotípicas incluyen propiedades morfológicas y reproductivas), sus propiedades físicas y químicas (tales como pesos secos y perfiles de lípidos) y sus secuencias de genes. En algunas realizaciones, los microorganismos aislados de la invención tienen propiedades fenotípicas sustancialmente idénticas del microorganismo depositado con el N.º de acceso de ATCC PTA-11615, N.º de acceso de ATCC PTA-11616 o N.º de acceso de ATCC PTA-11617. En algunas realizaciones, los microorganismos aislados de la invención tienen propiedades de crecimiento sustancialmente idénticas de los microorganismos depositados con el N.º de acceso de ATCC PTA-11615, N.º de acceso de ATCC PTA-11616 o N.º de acceso de ATCC PTA-11617.

La invención se refiere adicionalmente a una biomasa aislada que comprende los microorganismos aislados de la invención. Una biomasa aislada de la invención es una biomasa celular recogida obtenida por cualquier método convencional para el aislamiento de una biomasa microbiana.

La biomasa de la invención contiene un alto nivel de ácidos grasos. En algunas realizaciones, al menos el 30 % en peso del peso de las células secas de la biomasa de la invención son ácidos grasos. En algunas realizaciones, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, o al menos el 65 % en peso del peso de las células secas de la biomasa de la invención son ácidos grasos. En algunas realizaciones, la biomasa de la invención comprende del 30 % al 75 %, del 40 % al 75 %, del 45 % al 70 %, del 50 % al 70 %, del 55 % al 65 % de ácidos grasos por el peso de las células secas de la biomasa.

La invención se refiere adicionalmente a un cultivo que comprende uno o más microorganismos aislados de la invención. Se conocen en la técnica diversos parámetros de fermentación para inocular, cultivar y recuperar cepas de levadura. Puede usarse cualquier medio convencional para el crecimiento de levaduras.

Los cultivos de la invención contienen una alta cantidad de biomasa por litro de caldo de cultivo, que indica crecimiento eficaz de los microorganismos aislados. En algunas realizaciones, los cultivos comprenden al menos 1 g/l de biomasa de los microorganismos aislados de la invención. En algunas realizaciones, los cultivos comprenden al menos 2 g/l, al menos 3 g/l, al menos 4 g/l, al menos 5 g/l, al menos 6 g/l, al menos 7 g/l, al menos 8 g/l, al menos 9 g/l, o al menos 10 g/l de biomasa de los microorganismos aislados de la invención. En algunas realizaciones, los cultivos comprende 1 g/l a 10 g/l, 2 g/l a 10 g/l, 3 g/l a 10 g/l, 4 g/l a 10 g/l, 5 g/l a 10 g/l, 6 g/l a 10 g/l, 7 g/l a 10 g/l, 8 g/l a 10 g/l, o 9 g/l a 10 g/l de biomasa de los microorganismos aislados de la invención.

La presente invención se refiere adicionalmente a métodos de producción de aceites microbianos.

En algunas realizaciones, el método comprende cultivar un microorganismo aislado de la invención o mezclas de los mismos en un cultivo para producir un aceite microbiano. Los microorganismos aislados de la invención pueden cultivarse en presencia de diversas fuentes de carbono, que incluyen, por ejemplo, sacarosa, glucosa, fructosa, xilosa, glicerol, manosa, arabinosa, lactosa, galactosa, maltosa, celulosa, lignocelulosa, o combinaciones de las mismas. El método puede comprender además extraer el aceite microbiano. El aceite puede extraerse de una biomasa recién recogida o puede extraerse de una biomasa previamente recogida que se ha almacenado en condiciones que previenen el deterioro. Pueden usarse métodos conocidos para cultivar un microorganismo de la invención, para aislar una biomasa del cultivo, para extraer un aceite microbiano de la biomasa, y para analizar el perfil de ácidos grasos de aceites extraídos de la biomasa.

La invención se refiere adicionalmente a un aceite microbiano producido por los métodos de la invención. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende un perfil de ácidos grasos que tiene las mismas características que el perfil de ácidos grasos de los microorganismos aislados de la invención. Un aceite microbiano de la invención puede ser cualquier aceite derivado de un microorganismo, que incluye, por ejemplo: un aceite en bruto extraído de la biomasa del microorganismo sin procesamiento adicional; un aceite refinado que se obtiene tratando un aceite microbiano en bruto con etapas de procesamiento adicional tales como refinado, blanqueamiento y/o desodorización; un aceite microbiano diluido obtenido diluyendo un aceite microbiano en bruto o refinado; o un aceite enriquecido que se obtiene, por ejemplo, tratando un aceite microbiano en bruto o refinado con métodos de purificación adicionales para aumentar la concentración de un ácido graso en el aceite.

La invención también se refiere al uso del microorganismo aislado, biomasa, cultivo o aceite microbiano de la invención para la fabricación de un alimento, suplemento dietético, cosmético o composición farmacéutica para un animal no humano o humano.

Composiciones

La invención se refiere adicionalmente a composiciones que comprenden un microorganismo aislado de la invención, una biomasa aislada de la invención, un aceite microbiano de la invención, o combinaciones de los mismos.

Un microorganismo aislado, biomasa o aceite microbiano de la invención puede modificarse químicamente o físicamente adicionalmente o procesarse basándose en los requisitos de la composición por cualquier técnica conocida.

Las células de los microorganismos o biomasas pueden secarse antes de uso en una composición por métodos que incluyen, pero no se limitan a, liofilización, secado por aire, secado por pulverización, secado en túnel, secado a vacío (liofilización), o un proceso similar. Alternativamente, una biomasa recogida y lavada puede usarse directamente en una composición sin secar.

5 Los aceites microbianos de la invención pueden usarse como material de partida para producir más eficazmente un producto enriquecido en un ácido graso. Por ejemplo, los aceites microbianos de la invención pueden someterse a diversas técnicas de purificación conocidas en la técnica, tales como destilación o aducción de urea, para producir un producto de mayor potencia con mayores concentraciones de un ácido graso particular. Los aceites microbianos de la invención también pueden usarse en reacciones químicas para producir compuestos derivados de ácidos grasos en los aceites, tales como ésteres y sales de un ácido graso.

15 Una composición de la invención puede incluir uno o más excipientes. Como se usa en el presente documento, "excipiente" se refiere a un componente, o mezcla de componentes, que se usa en una composición de la presente invención para dar características deseables a la composición, que incluye alimentos, además de composiciones farmacéuticas, cosméticas e industriales. Un excipiente de la presente invención puede describirse como un excipiente "farmacéuticamente aceptable" cuando se añade a una composición farmacéutica, que significa que el excipiente es un compuesto, material, composición, sal y/o forma de dosificación que está dentro del alcance del criterio médico sensato, adecuado para el contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otras complicaciones problemáticas durante la duración deseada del contacto proporcional a una relación beneficio/riesgo razonable. En algunas realizaciones, el término "farmacéuticamente aceptable" significa autorizado por una agencia reguladora del gobierno federal o uno estatal o enumerado en la farmacopea de los EE.UU. u otra farmacopea internacional generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. Pueden usarse diversos excipientes. En algunas realizaciones, el excipiente puede ser, pero no se limita a, un agente alcalino, un estabilizador, un antioxidante, un agente de adhesión, un agente de separación, un agente de recubrimiento, un componente de fase exterior, un componente de liberación controlada, un disolvente, un tensioactivo, un humectante, un agente de tamponamiento, una carga, un emoliente, o combinaciones de los mismos. Excipientes, además de aquellos tratados en el presente documento, pueden incluir excipientes enumerados en, aunque no se limitan a, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st ed. (2005). Está previsto que la inclusión de un excipiente en una clasificación particular en el presente documento (por ejemplo, "disolvente") ilustre en vez de limite la función del excipiente. Un excipiente particular puede entrar dentro de múltiples clasificaciones.

35 Las composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a, productos alimenticios, composiciones farmacéuticas, cosméticos y composiciones industriales.

40 En algunas realizaciones, la composición es un producto alimenticio. Un producto alimenticio es cualquier alimento para consumo animal o humano, e incluye composiciones tanto sólidas como líquidas. Un producto alimenticio puede ser un aditivo para alimentos animales o humanos. Los alimentos incluyen, pero no se limitan a, alimentos comunes; productos líquidos, que incluyen leches, bebidas, bebidas terapéuticas y bebidas nutricionales; alimentos funcionales; suplementos; nutracéuticos; leches de inicio, que incluyen leches de inicio para prematuros; alimentos para mujeres embarazadas o lactantes; alimentos para adultos; alimentos geriátricos; y alimentos para animales.

45 En algunas realizaciones, un microorganismo aislado, biomasa o aceite microbiano de la invención puede usarse directamente como o incluirse como un aditivo dentro de uno o más de: un aceite, grasa, unttable, otro componente graso, bebida, salsa, alimento basado en lácteo o basado en soja (tal como leche, yogurt, queso y helado), un alimento horneado, un producto nutricional, por ejemplo, como un suplemento nutricional (en forma de cápsula o de comprimido), un suplemento vitamínico, un suplemento dietético, una bebida en polvo, un producto alimenticio en polvo acabado o semi-acabado, y combinaciones de los mismos.

50 Una lista parcial de composiciones alimenticias que pueden incluir un aceite microbiano de la invención incluye, pero no se limita a, productos basados en soja (leches, helados, yogures, bebidas, cremas, unttables, cremas); sopas y mezclas de sopa; masas, pastas para rebozar y artículos alimenticios horneados que incluyen, por ejemplo, productos de panadería fina, cereales para el desayuno, pasteles, tartas de queso, tartas, magdalenas, galletas, barras, panes, rollos, galletitas, muffins, tortas, scones, picatostes, galletas saladas, productos dulces, bizcochos para picar, pasteles, barritas de granola/de picoteo, y pasteles para tostadora; dulces; confitería dura; chocolate y otros dulces; chicle; productos alimenticios líquidos, por ejemplo, leches, bebidas energéticas, leche de inicio, bebidas carbonatadas, té, comidas líquidas, zumos de frutas, bebidas basadas en frutas, bebidas basadas en verduras; jarabes multivitamínicos, sustitutos de comidas, alimentos medicinales y jarabes; mezclas de bebida en polvo; pasta; productos de pescado procesados; productos cárnicos procesados; productos de ave de corral procesados; salsas espesas y salsas; condimentos (kétchup, mayonesa, etc.); unttables basados en aceite vegetal; productos lácteos; yogurt; mantequillas; productos lácteos congelados; helados; postres congelados; yogures congelados; productos alimenticios semisólidos tales como alimentos infantiles; pudín y postres de gelatina; queso procesado y sin procesar; mezclas para tortitas; barritas alimenticias que incluyen barritas energéticas; mezclas para gofres; aderezos para ensalada; mezclas de sustitución de huevos; unttables de frutos secos y basados en frutos secos; aperitivos salados tales como patatas fritas y otros fritos o crujientes, fritos de maíz, nachos, tentempiés

extruidos, palomitas, pretzels, crujientes de patata, y frutos secos; especialmente tentempiés tales como salsas para mojar, tentempiés de frutos secos, tentempiés de carne, cortezas de cerdo, barritas dietéticas y tortas de arroz/maíz.

5 En algunas realizaciones, un aceite microbiano de la invención puede usarse para suplementar una leche de inicio. La leche de inicio puede estar complementada con un aceite microbiano de la invención solo o en combinación con un aceite físicamente refinado derivado de un microorganismo productor de ácido araquidónico (ARA).

10 En algunas realizaciones, la composición es un pienso para animales. Un "animal" significa cualquier organismo no humano que pertenece al reino Animalia e incluye, sin limitación, animales acuáticos y animales terrestres. El término "pienso para animales" o "alimento para animales" se refiere a cualquier alimento previsto para animales no humanos, tanto para peces; peces comerciales; peces ornamentales; larvas de peces; bivalvos; moluscos; crustáceos; marisco; gamba; larva de gamba; artemia; rotíferos; gamba de salmuera; filtradores; anfibios; reptiles; mamíferos; animales domésticos; animales de granja; animales de zoológico; animales para deportes; ganado para cría; animales para carreras; animales de exhibición; animales de reliquia; animales raros o en peligro de extinción; 15 animales de compañía; animales de mascota tales como perros, gatos, cobayas, conejos, ratas, ratones o caballos; primates tales como monos (por ejemplo, cebus, rhesus, verde africano, patas, cinomolgo y cercopithecus), simios, orangutanes, babuinos, gibones y chimpancés; cánidos tales como perros y lobos; félidos tales como gatos, leones y tigres; équidos tales como caballos, burros y cebras; animales de uso alimentario tales como vacas, ganado vacuno, cerdos y ovejas; ungulados tales como ciervo y jirafas; roedores tales como ratones, ratas, hámsteres y cobayas; etc. Un pienso para animales incluye, pero no se limita a, un pienso para acuicultura, un pienso para animales domésticos que incluye pienso para mascotas, un pienso para animales de zoológico, un pienso para animales de trabajo, un pienso para ganado, o una combinación de los mismos

25 En algunas realizaciones, la composición es un pienso o suplemento para pienso para cualquier animal cuya carne o productos vayan a ser consumidos por los seres humanos, tales como cualquier animal del que se deriva carne, huevos o leche para consumo humano. Cuando se alimenta a tales animales, nutrientes tales como ciertos ácidos grasos pueden incorporarse en la carne, leche, huevos u otros productos de tales animales para aumentar su contenido de estos nutrientes.

30 En algunas realizaciones, la composición es un material secado por pulverización que puede desmenuzarse para formar partículas de un tamaño apropiado para consumo por zooplancton, artemia, rotíferos y filtradores. En algunas realizaciones, el zooplancton, artemia o rotíferos alimentados por la composición son a su vez alimentados a larvas de pez, peces, moluscos, bivalvos o crustáceos.

35 En algunas realizaciones, la composición es una composición farmacéutica. Composiciones farmacéuticas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, una composición antiinflamatoria, un fármaco para el tratamiento de enfermedad cardíaca coronaria, un fármaco para el tratamiento de arteriosclerosis, un agente quimioterapéutico, un excipiente activo, un fármaco para la osteoporosis, un antidepresivo, un anticonvulsivo, un fármaco anti-Helicobacter pilori, un fármaco para el tratamiento de enfermedad neurodegenerativa, un fármaco para el tratamiento de enfermedad hepática degenerativa, un antibiótico, una composición hipocolesterolemizante y una composición reductora de triglicéridos. En algunas realizaciones, la composición es un alimento médico. Un alimento médico incluye un alimento que está en una composición que va a consumirse o administrarse externamente bajo la supervisión de un médico y que está prevista para el tratamiento dietético específico de una afección, para la que se establecen requisitos nutricionales distintivos, basándose en los principios científicos reconocidos, por evaluación 45 médica.

50 En algunas realizaciones, el aceite microbiano puede formularse en una forma de dosificación. Las formas de dosificación pueden incluir, pero no se limitan a, comprimidos, cápsulas, sellos, pellas, píldoras, polvos y gránulos, y formas de dosificación parenteral, que incluyen, pero no se limitan a, solución, suspensiones, emulsiones y polvos secos que comprenden una cantidad eficaz del aceite microbiano. También se conoce en la técnica que tales formulaciones también pueden contener diluyentes, cargas, disgregantes, aglutinantes, lubricantes, tensioactivos, vehículos hidrófobos, vehículos solubles en agua, emulsionantes, tampones, humectantes, hidratantes, solubilizantes, conservantes farmacéuticamente aceptables y similares. Las formas de administración pueden incluir, pero no se limitan a, comprimidos, comprimidos recubiertos de azúcar, cápsulas, comprimidos oblongos y píldoras, que contienen el aceite microbiano y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados. 55

60 Para administración por vía oral, el aceite microbiano puede combinarse con vehículos farmacéuticamente aceptables muy conocidos en la técnica. Tal vehículo permite que los aceites microbianos de la invención se formen como comprimidos, píldoras, comprimidos recubiertos de azúcar, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, lechadas, suspensión y similares, para ingestión oral por un sujeto que va a tratarse. En algunas realizaciones, la forma de dosificación es un comprimido, píldora o comprimido oblongo. Preparaciones farmacéuticas para uso oral pueden obtenerse añadiendo un excipiente sólido, opcionalmente moliendo la mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir auxiliares adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de comprimidos recubiertos de azúcar. Excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, cargas tales como azúcar, que incluyen, pero no se limitan a, lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, pero no se limitan a, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, 65

metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden añadirse agentes disgregantes, tales como, pero no se limitan a, la polivinilpirrolidona reticulada, agar, o ácido algínico o una sal del mismo tal como alginato de sodio. Preparaciones farmacéuticas que pueden usarse por vía oral incluyen, pero no se limitan a, cápsulas duras hechas de gelatina, además de cápsulas selladas blandas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol, o sorbitol.

En algunas realizaciones, la composición es un cosmético. Los cosméticos incluyen, pero no se limitan a, emulsiones, cremas, lociones, máscaras, jabones, champús, lavados, cremas faciales, acondicionadores, maquillajes, agentes de baño y líquidos en dispersión. Los agentes cosméticos pueden ser medicinales o no medicinales.

En algunas realizaciones, la composición es una composición industrial. En algunas realizaciones, la composición es un material de partida para una o más fabricaciones. Una fabricación incluye, pero no se limita a, un polímero; un material fotográfico fotosensible; un detergente; un aceite industrial; o un detergente industrial. Por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 7.259.006 describe el uso de grasa y aceite que contiene DHA para la producción de ácido behénico y la producción de materiales sensibles fotográficos usando ácido behénico.

En algunas realizaciones, la composición es un biocombustible basado en lípidos fabricado convirtiendo el aceite biológico de la invención en el biocombustible basado en lípidos mediante medios conocidos en la materia, tales como mediante transesterificación del aceite biológico para producir el biodiésel. Los diferentes usos de los aceites biológicos de la presente invención para fines de biocombustible basado en lípidos incluyen, pero no se limitan a, usos como agente de calefacción, biodiésel para transporte, combustible para aviones, aditivos de combustible, combustibles de especialidad y lubricantes. En algunas realizaciones, la conversión de aceites biológicos en biocombustibles basados en lípidos implica procesos químicos y técnicas de refinado conocidas en el campo técnico, que también pueden producir o usarse para producir compuestos químicos de especialidad similares a los destilados de petróleo.

Kits que comprenden las composiciones

La invención se refiere adicionalmente a kits o envases que contienen una o más unidades de una composición de la invención. Los kits o envases pueden incluir unidades de un producto alimenticio, composición farmacéutica, cosmético o composición industrial que comprende el microorganismo aislado, biomasa o aceite microbiano de la invención, o combinaciones de los mismos. Los kits o envases también pueden incluir un aditivo que comprende el microorganismo aislado, biomasa o aceite microbiano de la invención, o combinaciones de los mismos, para la preparación de un alimento, cosmético, composición farmacéutica o composición industrial.

En algunas realizaciones, el kit o envase contiene una o más unidades de una composición farmacéutica que va a administrarse según los métodos de la presente invención. El kit o envase puede contener una unidad de dosificación, o más de una unidad de dosificación (es decir, múltiples unidades de dosificación). Si están presentes múltiples unidades de dosificación en el kit o envase, las múltiples unidades de dosificación pueden estar opcionalmente dispuestas para administración secuencial.

Los kits de la presente invención pueden contener opcionalmente instrucciones asociadas a las unidades o formas de dosificación de los kits. Tales instrucciones pueden estar en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos, aviso que refleja la autorización por la agencia de la fabricación, uso o venta para administración humana para tratar una afección o trastorno. Las instrucciones pueden estar en cualquier forma que exprese información sobre el uso de las unidades o formas de dosificación en el kit según los métodos de la invención. Por ejemplo, las instrucciones pueden estar en forma de material impreso, o en forma de un dispositivo multimedia previamente grabado.

En el transcurso del examen de un paciente, un profesional médico puede determinar que la administración de uno de los métodos de la presente invención es apropiada para el paciente, o el médico puede determinar que la afección del paciente puede mejorarse por la administración de uno de los métodos de la presente invención. Antes de recetar cualquier pauta, el médico puede aconsejar al paciente, por ejemplo, sobre los diversos riesgos y beneficios asociados a la pauta. El paciente puede proveerse de la divulgación completa de todos los riesgos conocidos y la sospecha de riesgos asociados a la pauta. Tal asesoramiento puede proporcionarse verbalmente, además de en forma escrita. En algunas realizaciones, el médico puede proveer al paciente de materiales bibliográficos sobre la pauta, tal como información del producto, materiales educativos y similares.

La presente invención también se refiere a métodos de educar a los consumidores sobre los métodos de tratamiento, comprendiendo el método distribuir las formas de dosificación con información para el consumidor en el punto de venta. En algunas realizaciones, la distribución se producirá en un punto de venta que tiene un farmacéutico o proveedor de servicios médicos.

El término "información para el consumidor" puede incluir, pero no se limita a, un texto en inglés, texto no en inglés, imagen visual, diagrama, grabación telefónica, página web y acceso a un representante del servicio de atención al

cliente en directo. En algunas realizaciones, la información para el consumidor proporcionará indicaciones para el uso de las formas de dosificación según los métodos de la presente invención, uso a edad apropiada, indicación, contraindicaciones, dosificación apropiada, advertencias, número de teléfono de la dirección de la página web. En algunas realizaciones, el método comprende además proporcionar información profesional a personas relevantes en una posición para responder a preguntas del cliente referentes al uso de las pautas desveladas según los métodos de la presente invención. El término "información profesional" incluye, pero no se limita a, información referente a la pauta cuando se administra según los métodos de la presente invención que está diseñada para permitir que un profesional médico responda a las preguntas del cliente.

Un "profesional médico" incluye, por ejemplo, un médico, asistente del médico, enfermero practicante, farmacéutico y representante del servicio de atención al cliente.

Ejemplos

Ejemplo 1

Las identificaciones se determinaron para tres cepas de levadura: N.º de acceso de ATCC PTA-11615 (cepa 28428), (N.º de acceso de ATCC PTA-11616 (cepa 29404) y (N.º de acceso de ATCC PTA-11617 (cepa 29794). Las levaduras se sembraron en agar de malta. Se realizaron las extracciones de ADN y se realizaron análisis de secuencias génicas ribosómicas. Las comparaciones de homología de secuencias se hicieron entre las regiones D1D2 y ITS y las secuencias de ADN conocidas de cepas de levadura en las bases de datos públicas. También se realizó examen morfológico para las comparaciones con especies de levadura conocidas.

Las secuencias de ADN de la cepa 28428 (Fig. 1) coincidieron el 100 % con la secuencia de Genbank para la cepa tipo de *Pseudozyma aphidis* en la primera región analizada (dominios D1/D2 de la subunidad larga) y difirieron por 1 discordancia de la cepa tipo de *Pseudozyma rugulosa* (Fig. 2). En la segunda región (ITS), de las 545 coincidencias posibles, la cepa mostró 2 discordancias de la cepa tipo de *P. aphidis* y de nuevo 1 de la cepa tipo de *P. rugulosa*. (Fig. 3). Parece que las dos especies están estrechamente relacionadas, mostrando variabilidad genérica dentro de y entre ellas. Las características morfológicas también son muy similares entre *P. aphidis* y *P. rugulosa* y coincidieron las observaciones de morfología en la cepa 28428, que mostró colonias planas, opacas, de color crema amarillenta, con margen con flecos y células fusiformes, de tamaño variable, con gemación polar sobre dentículos cortos. Basándose en los datos a mano no es posible distinguir la identificación más específicamente que como cualquiera de *P. aphidis* o *P. rugulosa*.

Las secuencias de ADN de la cepa 29404 (Fig. 4) coincidieron perfectamente en ambas regiones con las secuencias de Genbank para CBS 484 de *Sporidiobolus pararoseus*. La comparación con la cepa tipo de la especie CBS 491 tuvo 2 discordancias en D1D2 y 2 en ITS (Figs. 5 y 6). Las características morfológicas (células ovoides, individuales o en cadenas cortas, colonias rojo coral brillantes con una superficie lisa y un margen entero) confirmaron la identificación. La identificación de esta cepa es *Sporidiobolus pararoseus*.

Las secuencias de ADN de la cepa 29794 (Fig. 7) mostraron una coincidencia de secuencia idéntica con la cepa tipo de *Rhodotorula ingeniosa* (CBS 4240) en los dominios D1D2 (Fig. 8) y solo una discordancia de las 590 posibles coincidencias en las regiones ITS (Fig. 9), que es posiblemente debido a variabilidad intra-específica. La morfología de las células y las colonias (células de ovoides a cilíndricas, individuales o en pares, una cápsula fina y colonias altamente mucoides amarillentas, brillantes) confirmó la identificación. La identificación de esta cepa es *R. ingeniosa*.

Ejemplo 2

Se cultivaron microorganismos aislados de *Sporidiobolus pararoseus* y *Rhodotorula ingeniosa* en ¼ x medio BFGM (Tabla 1). Cada cepa se cogió de una placa de agar y se inoculó en un matraz oscilante. El matraz oscilante se usó entonces para inocular otro matraz (matraz Erlenmeyer de 250 ml que contiene 50 ml de medio) que entonces se cultivó durante 7 días. Después de 7 días el matraz se recogió por centrifugación, el sedimento se lavó con agua y se centrifugó de nuevo. El sedimento final se liofilizó, se midió el peso y a continuación se determinaron la grasa total (ácidos grasos totales) y el perfil de ácidos grasos por el procedimiento de FAME.

El microorganismo aislado de *Pseudozyma aphidis/rugulosa* se cultivó en el medio de a continuación (Medio 2) y se determinó el perfil de ácidos grasos. Los resultados del análisis del perfil de ácidos grasos para las tres cepas se muestran en la Tabla 2.

Medio 2:

15 g/l de sales marinas artificiales Reef Crystal
1 g/l de glucosa
1 g/l de glutamato de monosodio
0,2 g/l de extracto de levadura
1 ml/l de mezcla de vitaminas*
5 ml/l de mezcla de metal traza PII**

ES 2 586 384 T3

0,1 g/l de penicilina G

0,1 g/l de sulfato de estreptomicina

* La mezcla de vitaminas contiene 100 mg/l de tiamina, 0,5 mg/l de biotina, 0,5 g/l de cianocobalamina ** La mezcla de metal traza PII contiene:

5 6,0 g/l de EDTA de Na₂

0,29 g/l de FeCl₃ 6H₂O

6,84 g/l de H₃BO₃

0,86 g/l de MnCl₂ 4H₂O

0,06 g/l de ZnCl₂

10 0,026 g/l de CoCl₂ 6H₂O

0,052 g/l de NiSO₄ 6H₂O

0,002 g/l de CuSO₄ 5H₂O

0,005 g/l de Na₂MoO₄ 2H₂O

Tabla 1: 1/4 x medio BFGM

Componente	Cantidad por litro (g)	[Solución madre] (g/l)	ml de solución madre a usar por litro	g/l																			
				Na	K	Mg	Ca	Cl	Fe	Cu	Mn	Co	Zn										
NaCl	0,625	seca																					
KCl	1	50	20 ml		0,25									0,38									
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5	227	22 ml		0,52									0,48									
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,05	190	0,2625 ml							0,47													
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,29	seca									0,08			0,14									
MSG monohidratado	0,5	seca																					
Tastone 154	0,5	seca																					
HEPES (100 mM) pH7	23,8	seca																					
KH ₂ PO ₄	0,025	56,5	0,4425	añadir después de esterilizar en autoclave																			
Sacarosa	50	500	100 ml	añadir después de esterilizar en autoclave																			
Metales traza																							
Vitaminas																							
Solución de metal traza																							
Acido cítrico	1,0 g	seca																					
FeSO ₄ ·7H ₂ O	10,3 mg	5,15																					
MnCl ₂ ·4H ₂ O	3,1 mg	1,55																					
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1,93 mg	0,965																					
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,04 mg	0,02																					
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,04 mg	0,02																					
CuSO ₄ ·5H ₂ O	2,07 mg	1,035																					
NiSO ₄ ·6H ₂ O	2,07 mg	1,035																					
pH a 2,5 con HCl																							
Solución de vitaminas																							
Vitamina B12	0,16 mg	0,16																					
Tiamina	9,75 mg	9,75																					
Pantotenato de Ca	3,33 mg	3,33																					
Iones totales (ppm)		995,8536																					

ES 2 586 384 T3

Tabla 2

Medios	1/4 BFGM			Medio 2	
Microorganismo	<i>Rhodotorula ingeniosa</i>		<i>Sporidiobolus pararseus</i>	<i>Pseudozyma aphidis/rugulosa</i>	
Azúcar	Sacarosa	Xilosa	Sacarosa	Glucosa	
Temperatura (°C)	27	27	22,5	30 °C	
Biomasa g/l	9,506	5,338	8,79		
Microorganismo	<i>Rhodotorula ingeniosa</i>		<i>Sporidiobolus</i>	<i>Pseudozyma aphidis/rugulosa</i>	
Azúcar	Sacarosa	Xilosa	Sacarosa	Glucosa	
pH	6,9	6,78	6,68		
% de 08:0	0,00	0,00	0,00		
% de 09:0	0,00	0,00	0,00		
% de 10:0	0,00	0,00	0,00		
% de 11:0	0,00	0,00	0,00		
% de 11:1	0,00	0,00	0,00		
% de 12:0	0,00	0,00	0,00		
% de 12:1	0,00	0,00	0,00		
% de 13:0	0,17	0,18	0,00		
% de 13:1	0,00	0,00	0,00		
% de 14:0	0,58	0,73	0,00	0,8	
% de 14:1	0,00	0,00	0,00	Traza (<1,0 %)	
% de 15:1	0,00	0,00	0,00		
% de 16:0	18,14	19,62	16,02	21,9	
% de 16:1	0,64	0,69	0,29	6,6	
% de 16:2	0,00	0,00	0,00		
% de 16:3	0,00	0,00	0,00		
% de 17:0	0,00	0,00	0,11		
% de 18:0	3,88	4,13	4,86	2,1	
% de 18:1 n-9	61,79	59,54	60,78	40,4	
% de 18:1 n-7	0,43	0,19	0,00		
% de 18:2	8,83	9,76	9,75	24,7	
% de 18:3 n-6	0,06	0,00	0,00		
% de 18:3 n-3	2,71	2,54	4,72		
% de 18:4 n-3	0,00	0,00	0,00		
% de 20:0	1,18	0,92	0,00	0,8	
% de 20:1 n-9	0,29	0,30	0,00	0,5	
% de 20:2	0,00	0,00	0,00		
% de 20:3 n-9	0,00	0,00	0,00		
% de 20:3 n-6	0,00		0,00		
20:3 n-3	0,00	0,00	0,00		
% de 20:4 ARA	0,00	0,14	0,00		
% de 20:5 n-3	0,00	0,00	0,00		
EPA					
% de 22:0	0,54	0,55	0,00	1,1	
% de 22:1	0,00	0,00	0,00		
% de 22:2	0,17	0,21	0,00		
% de 22:3	0,00	0,00	0,00		
% de 22:4 n-6	0,00	0,00	0,00		
% de 22:5 n-6	0,00	0,00	0,00		
% de 22:5 n-3	0,00	0,00	0,00		
% de 22:6 n-3	0,00	0,00	0,00		
DHA					
% de 24:0	0,21	0,20	0,00	1,1	
% de 24:1	0,00	0,00	0,00		
% de grasa	55,19	45,79	65,17		
% de desconocido	0,38	0,31	3,46		
08:0	0,00	0,00	0		
09:0	0,00	0,00	0		
10:0	0,00	0,00	0		
11:0	0,00	0,00	0		

ES 2 586 384 T3

Medios	1/4 BFGM			Medio 2	
	Microorganismo	<i>Rhodotorula ingenirosa</i>	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	<i>Pseudozyma aphidis/rugulosa</i>	
11:1	0,00	0,00			
12:0	0,00	0,00	0		
12:1			0		
13:0	6,04	5,70	0		
13:1	0,00	0,00	0		
14:0	20,92	22,93	0		
14:1	0,00	0,00	0		
15:0 INT STD	681,22	684,35	112753		
15:1	0,00	0,00	0		
16:0	654,11	617,77	110650		
16:1	23,02	21,84	2025		
16:2					
16:3					
17:0	0,00	0,00	759		
18:0	140,00	129,99	33583		
18:1 n-9	2227,57	1874,95	419870		
18:1 n-7	15,60	6,08	0		
18:2	318,37	307,24	67375		
18:3 n-6	2,23	0,00	0		
18:3 n-3	97,78	79,91	32596		
18:4 n-3					
20:0	42,43	28,86	0		
20:1 n-9	10,38	9,59	0		
20:2	0,00	0,00	0		
20:3 n-9					
20:3 n-6	0,00	0,00	0		
20:3 n-3	0,00	0,00	0		
20:4 ARA	0,00	4,40	0		
20:5 n-3 EPA	0,00	0,00	0		
22:0	19,48	17,18	0		
22:1	0,00	0,00	0		
22:2	6,08	6,67	0		
22:3	0,00	0,00	0		
22:4 n-6	0,00	0,00	0		
22:5 n-6	0-00	0,00	0		
22:5 n-3	0,00	0-00	0		
22:6 n-3 DHA	0,00	0,00	0		
23:0 INT STD	0,00	0,00	0		
24:0	7,55	6,45	0		
24:1	0,00	0,00	0		
Área total	4286,43	3833,56	803514		
Total	3605,22	3149,22	690761		

Ejemplo 3

5 Se cultivaron microorganismos aislados que tienen secuencias de ADN coincidentes con las del N.º de acceso de ATCC PTA-11615 (*Pseudozyma aphidis/rugulosa*; cepa 28428), N.º de acceso de ATCC PTA-11616 (*Sporidiobolus pararoseus*; cepa 29404) y N.º de acceso de ATCC PTA-11617 (*Rhodotorula ingenirosa*; cepa 29794) y se determinaron la grasa total (ácidos grasos totales) y los perfiles de ácidos grasos. Los resultados se muestran en las Tablas 3 y 4.

Tabla 4

Cepa N.º:	<i>Pseudozyma aphidis/rugulosa</i>
Medio:	Cepa 28426
Azúcar:	Medio 2
Ácido graso	Glucosa
	% de ácidos grasos totales (% en área)
14:0	
14:1	
16:0	27,4
16:1	1,4
18:0	9,6
18,1	31,5
18:2	28,0
20:0	0,4
20:1	1,6
22:0	0,2
24:0	

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un microorganismo aislado seleccionado de la lista que incluye el microorganismo depositado con el N.º de acceso de ATCC PTA-11615, el microorganismo depositado con el N.º de acceso de ATCC PTA-11616 y el microorganismo depositado con el N.º de acceso de ATCC PTA-11617.
2. Una biomasa aislada que comprende el microorganismo aislado de la reivindicación 1 o mezclas del mismo.
- 10 3. La biomasa aislada de la reivindicación 2, en la que al menos el 30 % en peso del peso de las células secas de la biomasa son ácidos grasos.
4. Un cultivo que comprende el microorganismo aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o mezclas del mismo.
- 15 5. El cultivo de la reivindicación 4, en el que el cultivo comprende al menos 5 g/l de biomasa del microorganismo aislado.
- 20 6. Un método de producción de un aceite microbiano, que comprende: cultivar el microorganismo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o un microorganismo aislado que es de la especie *Sporidiobolus pararoseus*, en el que el microorganismo es capaz de producir un aceite microbiano que comprende menos del 30 % en peso de ácidos grasos saturados, o mezclas de los mismos, en un cultivo para producir un aceite microbiano y extraer el aceite microbiano.
- 25 7. El método de la reivindicación 6, en el que el microorganismo aislado se cultiva en presencia de una fuente de carbono seleccionada del grupo que consiste en sacarosa, glucosa, fructosa, xilosa, glicerol, manosa, arabinosa, lactosa, galactosa, maltosa, celulosa, lignocelulosa, y combinaciones de los mismos.
- 30 8. Un método de producción de un aceite microbiano, que comprende extraer el aceite microbiano de la biomasa aislada de la reivindicación 2 o 3.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que se produce un cultivo que comprende biomasa del microorganismo aislado y el cultivo comprende al menos 5 g/l de la biomasa.
- 35 10. Uso del microorganismo aislado, biomasa, cultivo, o método de producción de un aceite microbiano de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para la fabricación de un alimento, suplemento, cosmético, o composición farmacéutica para un animal no humano o humano.

Figura 1. Secuencias de ADN de MK 28428

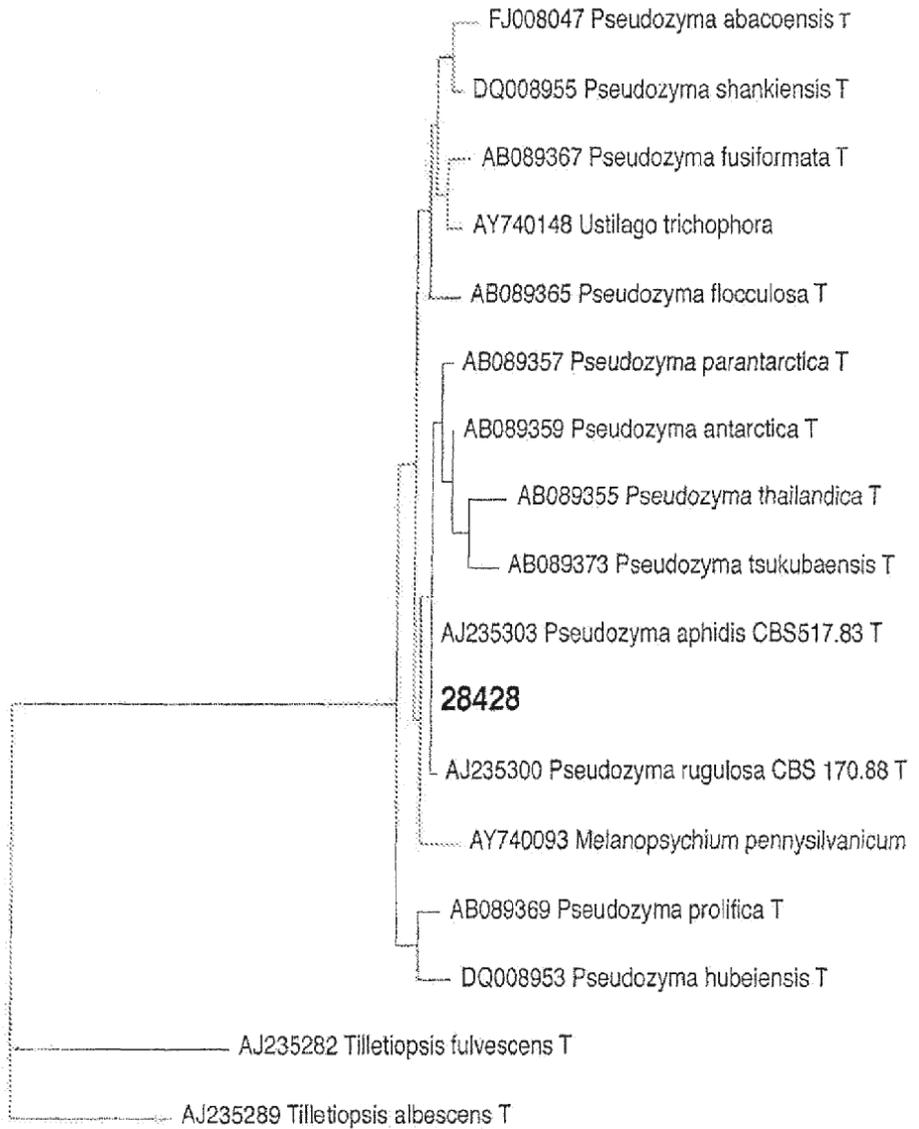
Secuencia de D1D2 de 28428

GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAACTAACAAGGATTCCCCTAGTAACG
GCGAGTGAAGAGGGGAAGAGCCCAAGATTGAAAGCTGGCGTCTTCGGCGTCC
GCATTGTAATCTCAAGAAGTGTTTTCCGCTTCGGACCAAGCCTAAGTCCCTTG
GAAAAGGGCATCATAGAGGGTGATAATCCCGTACATGGCTTGGAGCGCCCGA
AGCTTTGTGATACGCTTTCTAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAA
TGGGTGGTAAATGCCATCTAAGGCTAAATATTGGGGAGAGACCGATAGCGAA
CAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGA ACTTTGAAAAGAGAGTTAAACAG
TACGTGAAATTGCCAAAAGGGGAAGGGTAGGAGGTCAGAGATGCGGCCTGGG
ATTCAGCCTTGCTTTTGCTTGGTGTTTTTCCAGATTGCAGGCCAACGTGCGTT
TTGGGCACTGGAGAAGGGTAGGAGGAACGTGGCACCTCTCGGGGTGTGTTAT
AGCTCCTACTGGATACAGCGACCGAGACCGAGGACAGCAGCGTACTCGCAA
GAGCGGGCCTTCGGGCACCTTTACG

Secuencia de ITS de 28428

GTTGATACCATAGGATTTGAACGTAGATGAAACTCGACTGGTAATGCGGTG
TCTAAAATCTAAAAACA ACTTTTGGCAACGGATCTCTTGGTTCTCCCATCGAT
GAAGAACGCAGCGAATTGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAGTGAATCATC
GAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCCGGCAGATCTAATCTGGGGAGCATGC
CTGTTTGAGGGCCGCGAATTGTTTCGAACGACAGCTTTCTTATTTAGTTGAGA
AAGCTGGCGGATCGGTATTGAGGGTCTTGCCATCTTCCACGGTGGCTCCCTCG
AAATGCATTAGCGCATCCATTGATAGGCAAGACGGACGAAAGCTCGTTATT
TCGCCACGTCTTTCCCTGCCGGGTTTTGATAATATCAGGACTTCGGAGAGGA
GAGGCGCAGGGTTCGAGGAGCTGGACGCGACGTTTTGCTGGTTGGAGTGCTTC
TGAACCCCGCCCATGCCTCCCTTCTTCGGAAGGAGAGGAAGGGATTTAATTC
AATTCATCGGCCTCAGATTG

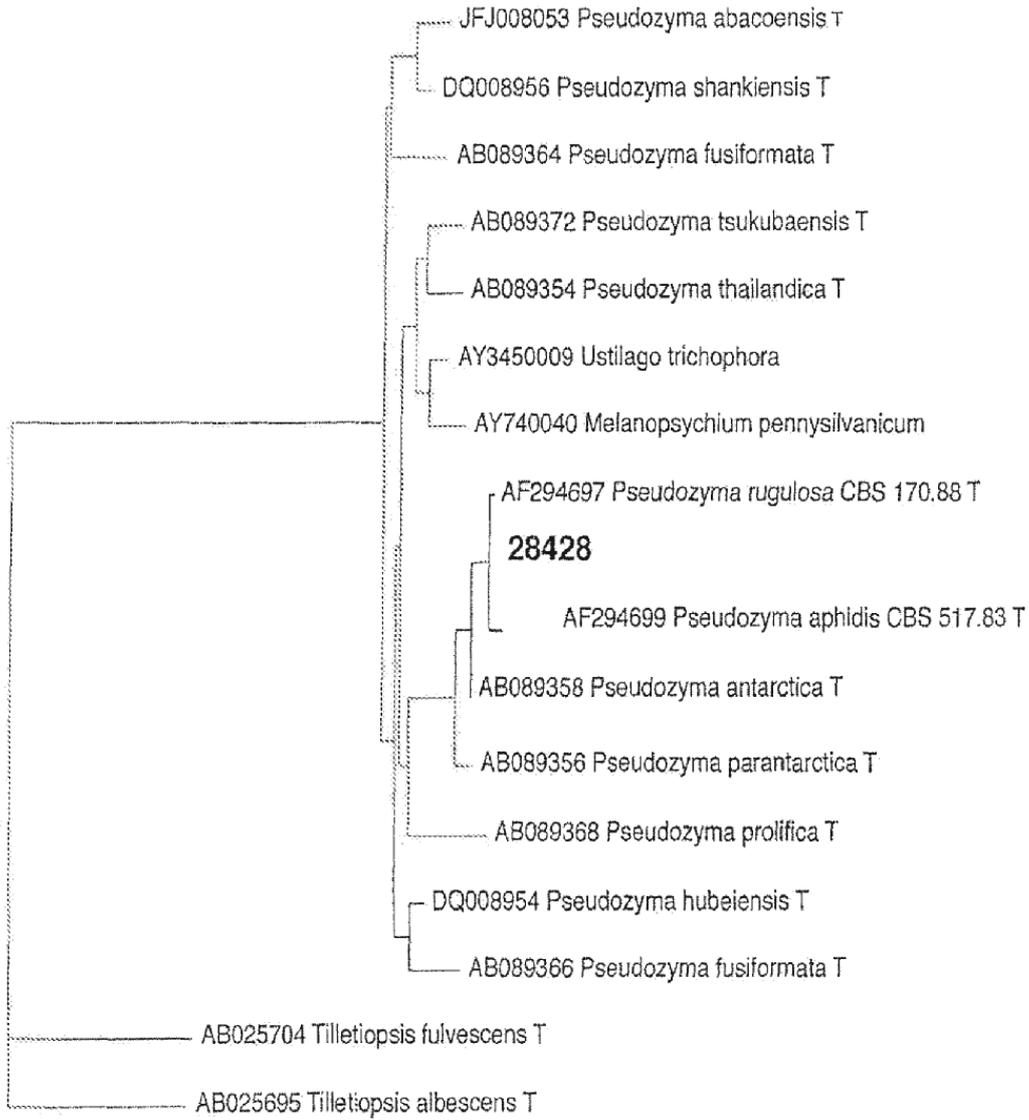
Figura 2. Árbol filogenético de secuencias de ADN de D1/D2 de MK 28428



Dominios D1D2

—0,01 sustituciones/sitio

Figura 3. Árbol filogenético de secuencias de ADN de ITS de MK 28428



Regiones ITS

___0,05 sustituciones/sitio

Figura 4. Secuencias de ADN de MK 29404

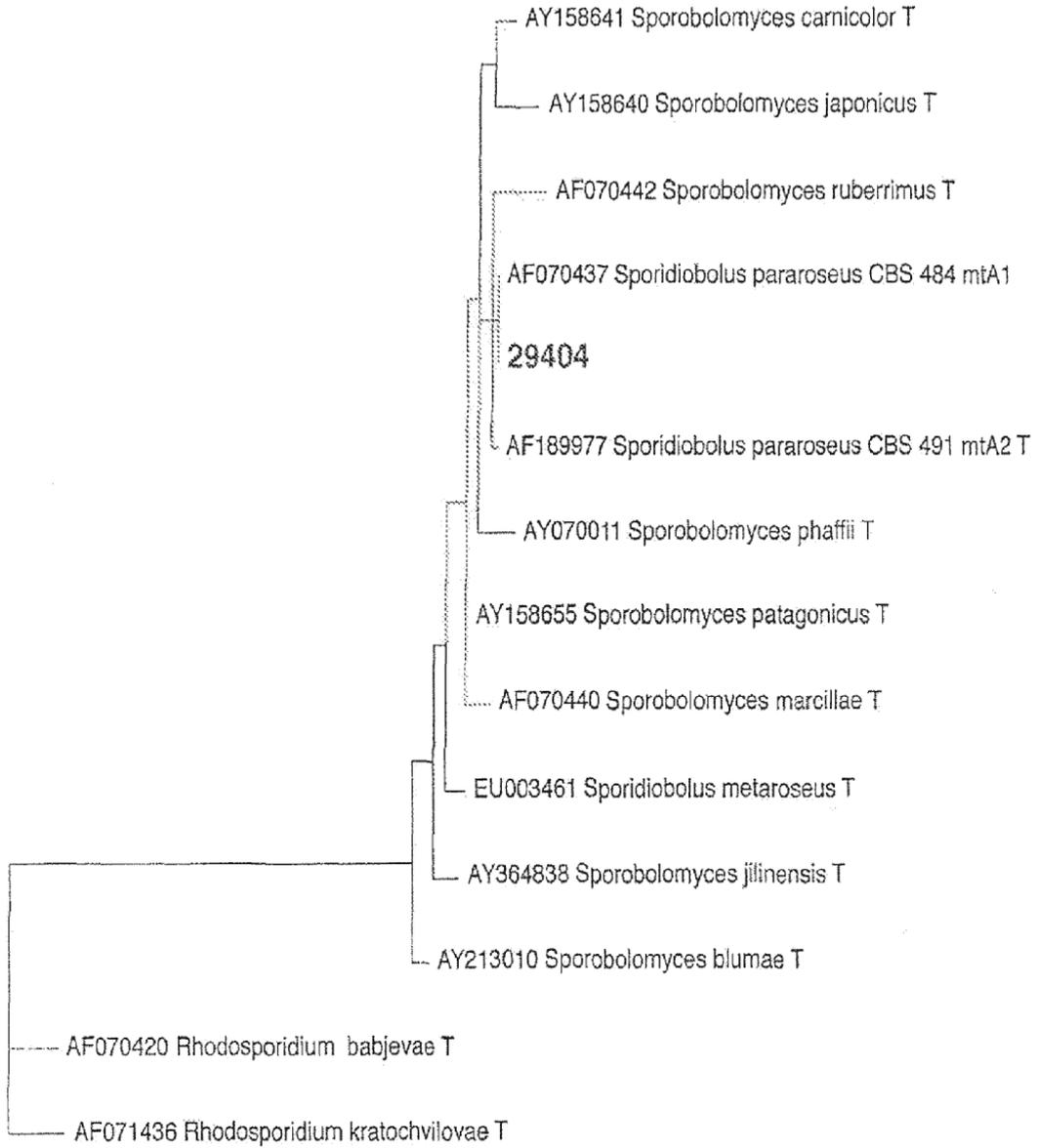
Secuencia de D1D2 de 29404

ATTCCCCTAGTAGCGGGCGAGCGAAGCGGGAAAAGCTCAAATTTGTAATCTGG
CGTCTTCGACGTCCGAGTTGTAATCICGAGAAGTGTTTTCCGTGATAGACCGC
ATACAAGTCTCTTGGAAACAGAGCGTCATAGTGGTGAGAAACCAGTACACGAT
GCGGATGCCTATTACTTTGTGATACACTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAA
TGCAGCTCAAATTTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAG
ACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGCACTTTGGAAAG
AGAGTTAACAGTACGTGAAATTTGTTGGAAGGGAAACACATGCACTGATACTT
GCTATTCGGGGCAACTCGATTGGCAGGCCCGCATCAGTTTTTCGGGGCGGAA
AATCGTAGAGAGAAGGTAGCAGTTTCGGCTGTGTTATAGCTCTTACTGGATT
CGCCCTGGGGGACTGAGGAACGCAGCGTCTTTTAGCATGAGCTTCGGCTTA
TCCACGCTTAGGATGCGGGTTTATGGCTGTATATGACCCGT

Secuencia de ITS de 29404

AACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAAAACAAGGG
TGTCCAATTTAACTTGGAAACCCAACTTCTCAATTCFAACTTTGTGCACTGT
ATTAATGGCGAGCAACTTCGGTTGTGAGCCTTCACTTACAAAACACTAGTCTA
TGAATGTAAAATTTTTATAACAAATAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGC
TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAG
AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGGCTCTCTGGTATTCCG
GAGAGCATGTCTGTTTGAGTGTTCATGAATCTTCAACCCAATCTTTTCTTGTA
ATCGATTGGTGTTTGGATTCTGAGCGTTGCTGGCGTTTGCCTAGCTCGTTCGT
AATACATTAGCATCCCTAATAACAAGTTTGGATTGACTTGGCGTAATAGACTAT
TCGCTAAGGATTCGGTGGAAACATCGAGCCAACCTTCATTAAGGAAGCTCCTA
ATTTAAAAGTCTACCTTTTGATTAGATCTCA

Figura 5. Árbol filogenético de secuencias de ADN de D1/D2 de MK 29404



Dominios D1D2

..... 0,01 sustituciones/sitio

Figura 6. Árbol filogenético de secuencias de ADN de ITS de MK 29404

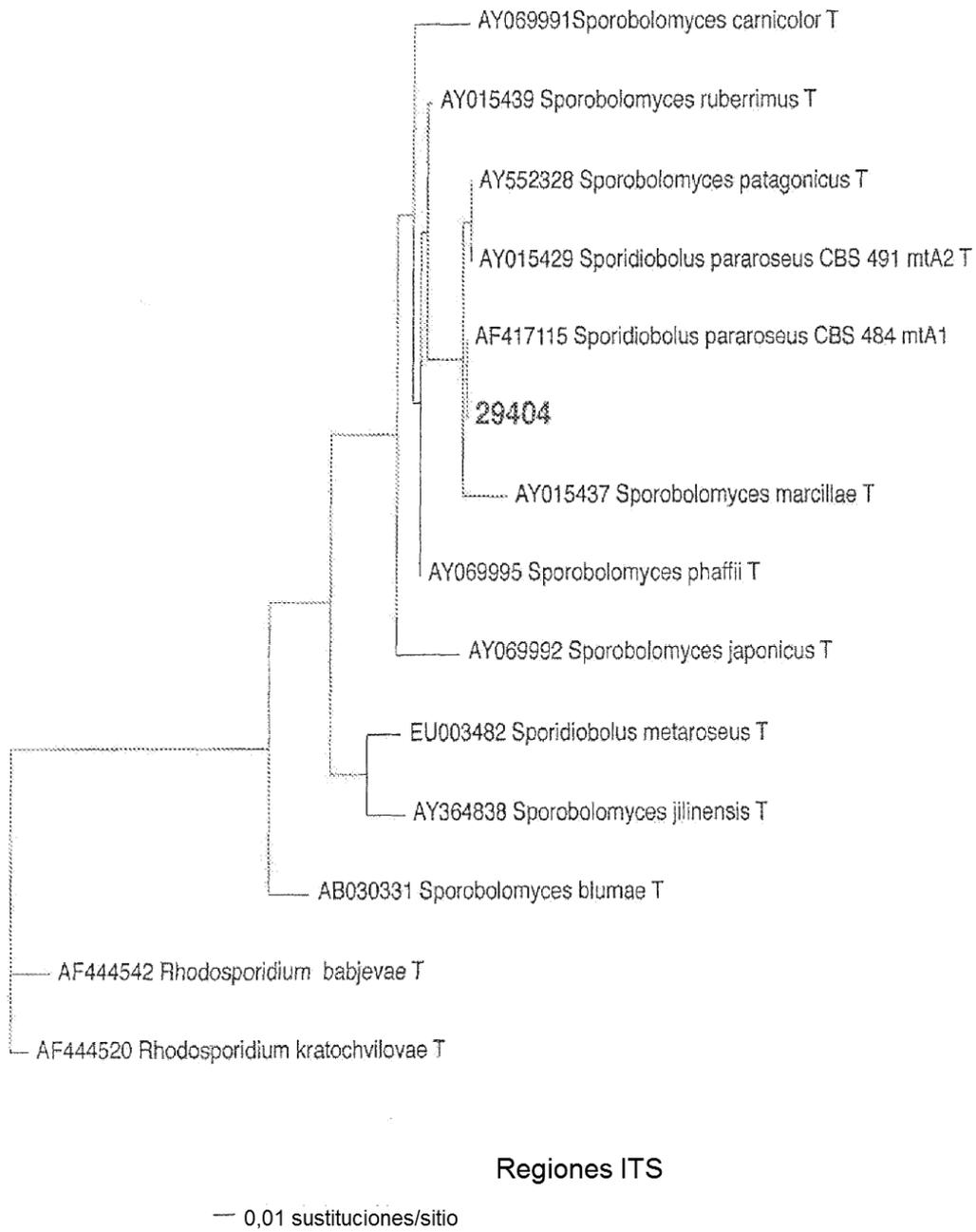


Figura 7. Secuencias de ADN de MK 29794

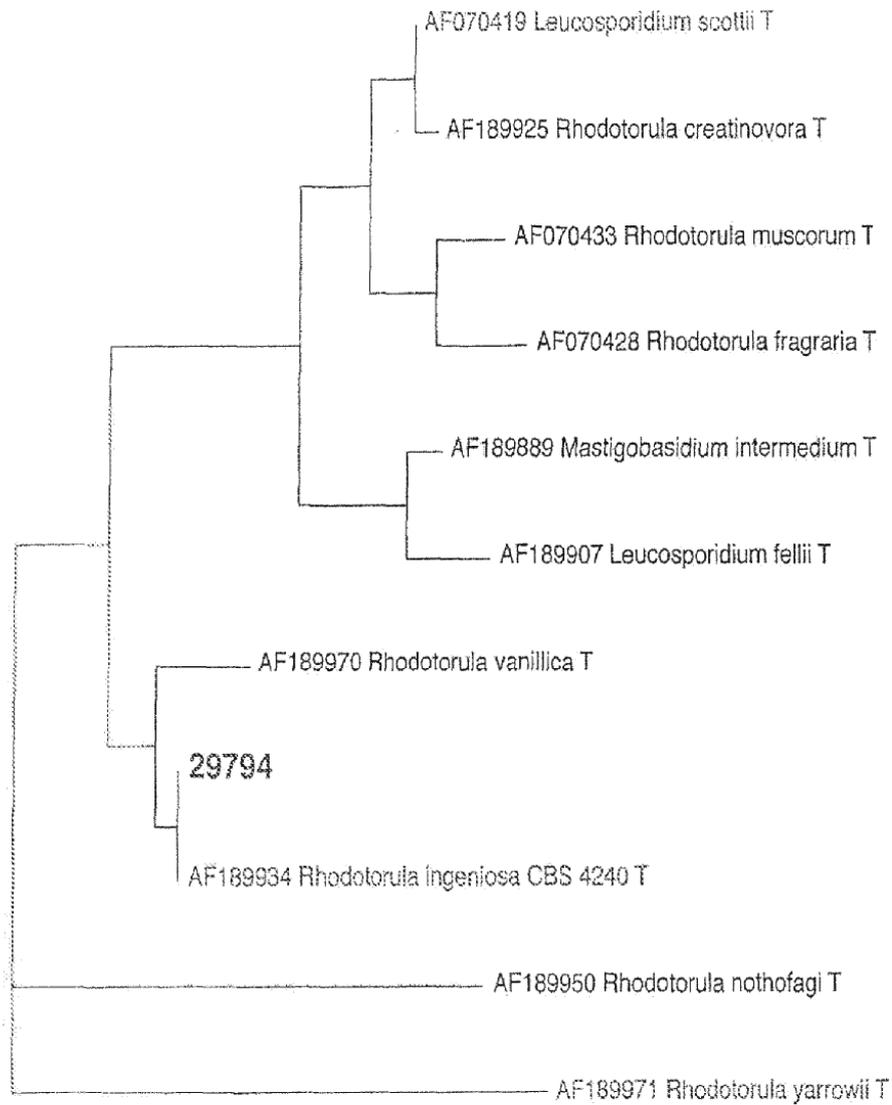
D1D2 de 29794

TAAGCGGAGGAAAAGAACTAACAAGGATTCCCCTAGTAACGGCGAGTGAA
GCGGGAAGAGCTCAAATTTGTAATCTGGCACTTTCAGTGTCCGAGTTGTAATC
TCGAGAAGTGTTTTCCGCGCCGGACCCGCATACAAGTCTGTTGGAATACAGCG
TCATAGTGGTGAGAACCCCGTAACTGATGCGGATGCCCGGTGCTTTGTGATA
CACTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAATTGGGTGGTAAA
TTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTG
AGGGAAAGATGAAAAGCACITTTGGAAAGAGAGTTAACAGTACGTGAAATTG
TTGGAAGGGAAACGCTTGAAGTCAGACTTGCTATTTGGAGTTCAGCCCATGG
TGTATTCTTCAATTTGCAGGCCAGCATCAGTTTTCGAGGGTGGAAAATCGTAG
TTTGAATGTAGCAGTTTCGGCTGTGTTATAGCTTTCTACTGGATTTCATCTTTGG
GGACTGAGGAACGCAGTGCCTTTTAGCAAGGCTCTCGAGCTTTACGCACCTT
AGGATGC

IITS de 29794

GACCTGCGGAAGGATCATTAGTGAATTTAGCGCATCTGCTTTGCAGAGCCGTG
ACCTCCACTTTCTAACTCTGTGCACCTTAATGGCGGAAGAGATGAAATATGCTC
TTCTGCGGCTCATTTTATAACACTAGTTAAAGAATGTAACGAAATATCGAAAC
AAAAAAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACG
CAGCGAAATGTGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAAT
CTTTGAACGCACCTTGCCTCCCTGGTATTCCGGGGAGCATGTCTGTTTGAGT
GTCATGAACTCTTCAACCCACCGGTTTCTTGTAACCTGGCTGGTGTGTTGGTTT
CTGAGTGTGCTCGTTCCTTGTGACTGAGCTCATTCGTAATATATGAGCATCTC
TAATTCGAATTCGGATTGACTCAGTGAATAGACTATTCCGCTGAGGACACACC
TAGTGTGGCCGAATAAGATAATTGTAGAAGCTTCTAACCTTCTAGTCATTTT
AAGATTAGACCTCAGATCAGATAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA
TAAGCGGAGGA

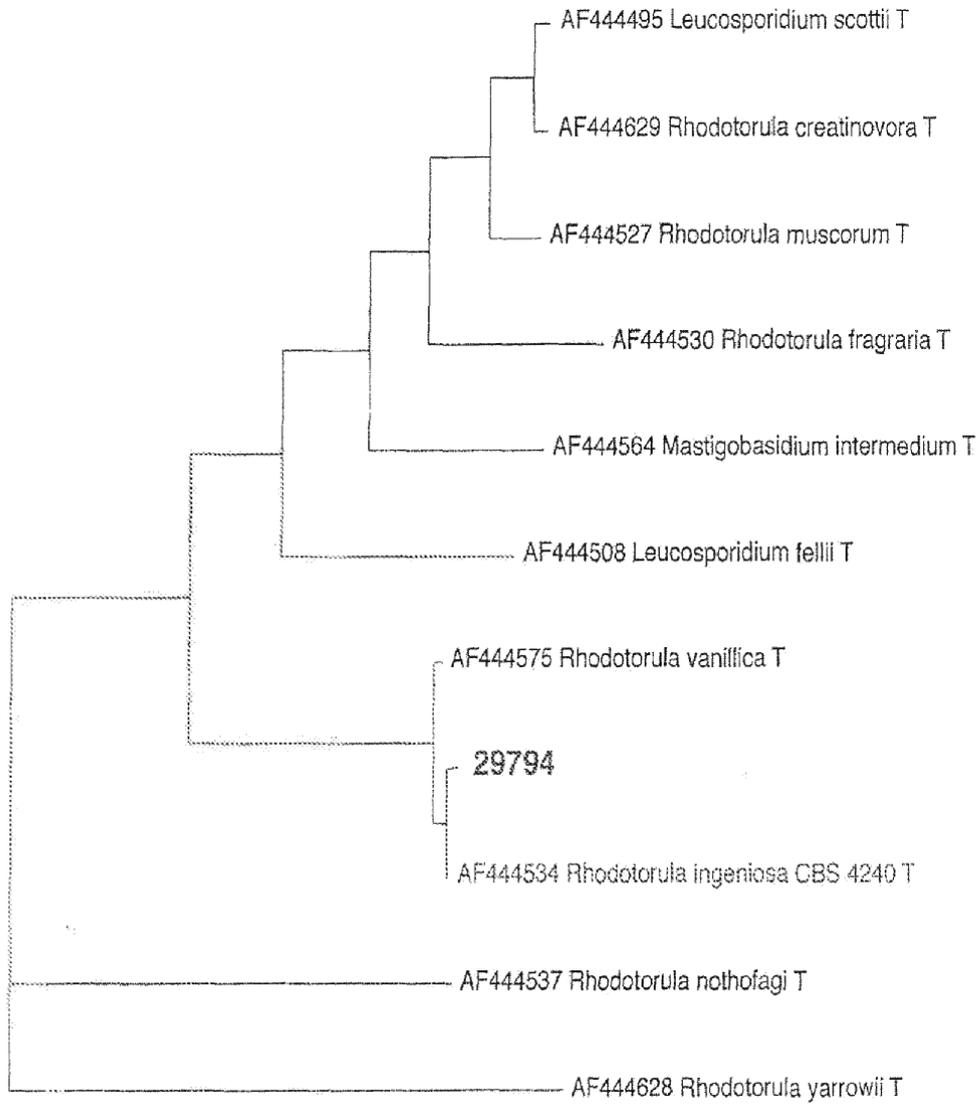
Figura 8. Árbol filogenético de secuencias de ADN de D1/D2 de MK 29794



Dominios D1D2

—— 0,005 sustituciones/sitio

Figura 9. Árbol filogenético de secuencias de ADN de ITS de MK 29794



Regiones ITS

—0,01 sustituciones/sitio