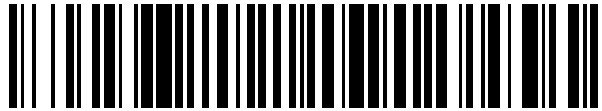


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 121**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/82** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.03.2009 PCT/US2009/001720**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.09.2010 WO10107415**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2009 E 09841993 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016 EP 2408922**

54 Título: **Composiciones de ácidos grasos de traustoquítridos y métodos de fabricación y usos de las mismas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.02.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**APT, KIRK, E.;  
PFEIFER, JOSEPH, W., III;  
HANSEN, JON, MILTON;  
BEHRENS, PAUL, WARREN;  
ZIRKLE, ROSS y  
STAHL, TRACEY, LYNN**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 602 121 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

Composiciones de ácidos grasos de traustoquítridos y métodos de fabricación y usos de las mismas.

**Antecedentes de la invención**

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a aceites microbianos.

**Técnica anterior**

10 Los ácidos grasos se clasifican en base a las características de longitud y saturación de la cadena carbonada. Los ácidos grasos de cadena corta tienen, en general, 12 carbonos o menos, los ácidos grasos de cadena media, en general, tienen 14 a 18 carbonos y los ácidos grasos de cadena larga tienen, en general, 20 carbonos o más. Los ácidos grasos se denominan ácidos grasos saturados cuando no presentan dobles enlaces entre los átomos de carbono y se denominan ácidos grasos insaturados cuando hay presentes dobles enlaces. Los ácidos grasos de cadena larga, insaturados, son monoinsaturados cuando sólo está presente un doble enlace y son poliinsaturados cuando está presente más de un doble enlace.

15 Los ácidos grasos poliinsaturados (todos por sus siglas en inglés) (los PUFA) se clasifican basándose en la posición del primer doble enlace del extremo metílico 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 de cadena larga omega-3 (LC-PUFA) con una longitud de cadena de 22 carbonos y 6 dobles enlaces, con frecuencia denominado como "22:6 n-3." Otros LC-PUFA omega-3 incluyen ácido eicosapentaenoico ("EPA"), denominado como "20:5 n-3" y ácido docosapentaenoico omega-3 ("DPA n-3"), denominado como "22:5 n-3." DHA y EPA se han denominado ácidos grasos "esenciales". Los LC-PUFA omega-6 incluyen ácido araquidónico ("ARA"), denominado como "20:4 n-6" y ácido docosapentaenoico omega-6 ("DPA n-6"), denominado como "22:5 n-6."

25 Los ácidos grasos omega-3 son moléculas biológicamente importantes que afectan a la fisiología celular debido a su presencia en las membranas celulares, regulan la producción y expresión génica de compuestos biológicamente activos y sirven como sustratos biosintéticos. Roche, H. M., Proc. Nutr. Soc. 58: 397-401 (1.999). El DHA, por ejemplo, justifica que aproximadamente el 15%-20% de los lípidos en la corteza cerebral humana, el 30%-60% de los lípidos en la retina, se concentra en los testículos y el esperma y es un componente importante de la leche materna. Jean-Pascal Bergé y Gilles Barnathan, *Fatty Acids from Lipids of Marine Organisms: Molecular Biodiversity, Roles as Biomarkers, Biologically Active Compounds and Economical Aspects*, en Marine Biotechnology I 49 (ed., T. Scheper, 2.005). El DHA justifica hasta un 97% de los ácidos grasos omega-3 en el cerebro y hasta un 93% de los ácidos grasos omega-3 en la retina. Además, el DHA es esencial para el desarrollo tanto fetal como infantil, así como el mantenimiento de las funciones cognitivas en los adultos. Igualmente, los ácidos grasos omega-3, incluyendo DHA y EPA, también poseen propiedades antiinflamatorias. Véase, por ej., *Id.* y Simopoulos, A. P., *J. Am. Coll. Nutr.* 21: 495-595 (2.002). Debido a que los ácidos grasos omega-3 no se sintetizan de novo en el cuerpo humano, estos ácidos grasos deben proceder de fuentes nutricionales.

40 Se considera que el aceite de linaza y los aceites de pescado son buenas fuentes dietéticas de ácidos grasos omega-3. El aceite de linaza no contiene EPA, DHA, DPA o ARA, pero en su lugar contiene ácido linolénico (C18:3 n-3), un bloque de construcción que permite que el cuerpo fabrique EPA. Hay evidencia, sin embargo, de que la velocidad de conversión metabólica puede ser lenta y variable, en particular entre aquéllos con salud deteriorada. Los aceites de pescado varían considerablemente en el tipo y el nivel de composición de ácidos grasos dependiendo de las especies particulares y sus dietas. Por ejemplo, el pescado criado por acuicultura tiende a tener un menor nivel de ácidos grasos omega-3 que aquéllos en estado salvaje. Además, los aceites de pescado soportan el riesgo de contener contaminantes medioambientales y pueden estar asociados a problemas de estabilidad y un olor o sabor sospechoso.

45 Los traustoquítridos son microorganismos del orden Traustoquiritales. Los traustoquítridos incluyen miembros del género *Schizochytrium* y han sido reconocidos como una fuente alternativa de ácidos grasos omega-3, incluyendo DHA. Véase, la patente de EE.UU. N° 5.130.242. Los aceites producidos a partir de estos microorganismos heterótrofos marinos con frecuencia presentan perfiles de ácidos grasos poliinsaturados más simples que los correspondientes aceites de pescado o de microalgas. Lewis, T. E., *Mar. Biotechnol.* 1: 580-587 (1.999). Se ha indicado que las cepas de la especie de traustoquítridos producen ácidos grasos omega-3 como un alto porcentaje de los ácidos grasos totales producidos por el organismo. La Patente de EE.UU. N° 5.130.242; Huang, J. et al., *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 78: 605-610 (2.001); Huang, J. et al., *Mar. Biotechnol.* 5: 450-457 (2.003). Sin embargo, los traustoquítridos aislados varían en la identidad y las cantidades de los LC-PUFA producidos, de manera que algunas cepas descritas previamente pueden presentar niveles no deseables de ácidos grasos omega-6 y/o pueden demostrar baja productividad en cultivo. De por sí, existe una continua necesidad del aislamiento de los traustoquítridos, que demuestra alta productividad y perfiles deseables de LC-PUFA.

**Breve resumen de la invención**

La presente invención se refiere a un aceite microbiano como se define en la reivindicación 1.

5 La presente descripción también se refiere a un microorganismo traustóquitrado aislado de la especie de traustóquitrados depositada con el N° de Acceso ATCC PTA-9695 o una cepa procedente de ahí, en la que los ácidos grasos totales producidos por dicho microorganismo o cepa procedente de ahí comprenden aproximadamente 10% o menos en peso de ácido eicosapentaenoico.

10 La presente descripción se refiere también a un microorganismo traustóquitrado aislado con las características de la especie de traustóquitrados depositada con el N° de Acceso ATCC PTA-9695, en la que los ácidos grasos totales producidos por dicho microorganismo o cepa procedente de ahí comprenden aproximadamente 10% o menos en peso de ácido eicosapentaenoico.

15 La presente descripción también se refiere a un microorganismo de traustóquitrados aislado o una cepa procedente de ahí, que comprende una fracción de triglicéridos, en la que el contenido en ácido docosahexaenoico de la fracción de triglicéridos es al menos aproximadamente 40% en peso, en la que el contenido en ácido docosapentaenoico n-6 de la fracción de triglicéridos es de al menos aproximadamente 0,5% en peso a aproximadamente 6% en peso y en la que los ácidos grasos totales producidos por dicho microorganismo o cepa procedente de ahí comprenden aproximadamente 10% o menos en peso de ácido eicosapentaenoico.

20 La presente descripción se refiere también a un microorganismo de traustóquitrados aislado de la misma especie que el traustóquitrado depositado con el N° de Acceso ATCC PTA-9695 o cepa procedente de ahí, en la que los ácidos grasos totales producidos por dicho microorganismo o cepa procedente de ahí comprenden aproximadamente 10% o menos en peso de ácido eicosapentaenoico.

En algunas realizaciones, la cepa procedente del microorganismo traustóquitrado aislado de la descripción es una cepa mutante.

La presente descripción también se refiere a un microorganismo aislado depositado con el N° de Acceso ATCC PTA-9695, PTA-9696, PTA-9697 o PTA-9698.

25 La presente descripción también se refiere a una biomasa de traustóquitrado que comprende uno cualquiera de los microorganismos traustóquitrados de la descripción o mezclas de los mismos.

30 La presente descripción también se refiere a una biomasa de traustóquitrados aislada, en la que al menos aproximadamente 50% en peso del peso de células seco de la biomasa son ácidos grasos y en la que al menos aproximadamente 50% en peso de los ácidos grasos son ácidos grasos omega-3. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente 50% en peso de los ácidos grasos es ácido docosahexaenoico. La presente descripción también se refiere a una biomasa de traustóquitrado aislada, en la que al menos aproximadamente 25% en peso del peso de células seco de la biomasa es ácido docosahexaenoico.

35 En algunas realizaciones, la presente descripción se refiere también a una biomasa de traustóquitrados aislada en la que aproximadamente el 10% o menos en peso de los ácidos grasos es ácido eicosapentaenoico y en la que la relación en peso de ácido docosahexaenoico a ácido eicosapentaenoico es al menos aproximadamente 5:1.

En algunas realizaciones, la presente descripción se refiere también a una biomasa de traustóquitrados aislada en la que aproximadamente 1,5% o menos en peso de los ácidos grasos es ácido araquidónico y en la que la relación en peso de ácido docosahexaenoico a ácido araquidónico es al menos aproximadamente 20:1.

40 En algunas realizaciones, la presente descripción se refiere también a una biomasa de traustóquitrados aislada que comprende ácido docosahexaenoico y ácido docosapentaenoico n-6 en una relación en peso de al menos aproximadamente 10:1.

La presente descripción se refiere también a un cultivo de traustóquitrado aislado que comprende uno cualquiera de los microorganismos traustóquitrados de la invención o mezclas de los mismos. En algunas realizaciones, el cultivo comprende al menos aproximadamente 5% de oxígeno disuelto.

45 La presente descripción se refiere también a un producto alimenticio, cosmético o composición farmacéutica para animales o seres humanos que comprende uno cualquiera de los microorganismos traustóquitrados o biomasas de la descripción o mezclas de los mismos.

50 La presente invención se refiere a un aceite microbiano que comprende una fracción de triglicéridos de al menos 70% en peso, en la que el contenido en ácido docosahexaenoico de la fracción de triglicéridos es al menos 50% en peso y en la que el contenido en ácido docosapentaenoico n-6 de la fracción de triglicéridos es de 0,5% en peso a 6% en peso. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende además un contenido en ácido araquidónico de la fracción de triglicéridos de aproximadamente 1,5% o menos en peso.

La presente invención también se refiere a un aceite microbiano que comprende una fracción de triglicéridos de al

menos 70% en peso, en la que el contenido en ácido docosahexaenoico de la fracción de triglicéridos es al menos 40% en peso, en la que el contenido en ácido docosapentaenoico n-6 de la fracción de triglicéridos es de al menos 0,5% en peso a 6% en peso y en la que la relación de ácido docosahexaenoico a ácido docosapentaenoico n-6 es mayor que 6:1.

- 5 La presente descripción se refiere también a un aceite microbiano que comprende una fracción de triglicéridos de al menos aproximadamente 70% en peso, en la que el contenido en ácido docosahexaenoico de la fracción de triglicéridos es al menos aproximadamente 60% en peso.

10 En algunas realizaciones, al menos aproximadamente 20% de los triglicéridos en la fracción de triglicéridos del aceite microbiano contiene ácido docosahexaenoico en dos posiciones en el triglicérido seleccionadas de dos cualesquiera de las posiciones *sn-1*, *sn-2* y *sn-3*. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente 5% de los triglicéridos en la fracción de triglicéridos del aceite microbiano contiene ácido docosahexaenoico en las tres posiciones *sn-1*, *sn-2* y *sn-3* en el triglicérido.

En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende además aproximadamente 5% o menos en peso de ácido heptadecanoico.

- 15 La presente invención también se refiere a un producto alimenticio, cosmético o composición farmacéutica para animales o seres humanos que comprende cualquiera de los aceites microbianos de la invención. En algunas realizaciones, el producto alimenticio es una fórmula infantil. En algunas realizaciones, la fórmula infantil es adecuada para bebés prematuros. En algunas realizaciones, el producto alimenticio es una leche, una bebida, una bebida terapéutica, una bebida nutricional o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, el producto alimenticio es un aditivo para alimento para animales o seres humanos. En algunas realizaciones, el producto alimenticio es un suplemento nutricional. En algunas realizaciones, el producto alimenticio es un pienso. En algunas realizaciones, el pienso es un pienso para acuicultura. En algunas realizaciones, el pienso es un pienso para animales domésticos, un pienso para animales de zoológico, un pienso para animales de trabajo, un pienso para ganado o una combinación de los mismos.

- 25 La presente descripción también se refiere a un método para producir un aceite microbiano que comprende ácidos grasos omega-3, comprendiendo el método: (a) cultivar uno cualquiera de los microorganismos traustóquidos aislados de la invención o mezclas de los mismos en un cultivo para producir una biomasa y (b) extraer un aceite que comprende ácidos grasos omega-3 de la biomasa. En algunas realizaciones, el cultivo comprende al menos aproximadamente 5% de oxígeno disuelto. En algunas realizaciones, el pH del cultivo se mantiene a aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,5. En algunas realizaciones, la temperatura del cultivo se mantiene a aproximadamente 17 °C a aproximadamente 30°C. En algunas realizaciones, el cultivo comprende una concentración de glucosa de aproximadamente 5 g/l a aproximadamente 50 g/l.

- 30 La presente descripción se refiere también a un método para producir un aceite microbiano que comprende ácidos grasos omega-3, comprendiendo el método extraer un aceite que comprende ácidos grasos omega-3 de una cualquiera de las biomásas de la descripción. En algunas realizaciones, el aceite microbiano se extrae usando un procedimiento de extracción de hexano. En algunas realizaciones, el aceite microbiano se extrae usando un procedimiento de extracción sin disolvente.

- 35 En algunas realizaciones, el peso de células seco de la biomasa aislado de cada litro de uno cualquiera de los cultivos de la descripción es al menos aproximadamente 50 g después de cultivo durante 7 días a aproximadamente 17°C a aproximadamente 30°C en un medio de cultivo de aproximadamente pH 6,5 a aproximadamente pH 8,0 que comprende fuentes de carbono, nitrógeno y nutrientes y aproximadamente 950 ppm a aproximadamente 8.500 ppm iones cloruro.

- 40 En algunas realizaciones, uno cualquiera de los cultivos aislados de la descripción presenta una productividad de ácidos grasos omega-3 de al menos aproximadamente 2 g/l/día después de cultivo durante aproximadamente 7 días a aproximadamente 17°C a aproximadamente 30°C en un medio de cultivo de aproximadamente pH 6,5 a aproximadamente pH 8,0, que comprende fuentes de carbono, nitrógeno y nutrientes y aproximadamente 950 ppm a aproximadamente 8.500 ppm de iones cloruro.

El aceite microbiano según la invención puede producirse por un método de la descripción.

- 45 La presente descripción se refiere también al uso de cualquiera de los microorganismos aislados, biomásas o aceites microbianos de la invención o mezclas de los mismos, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de inflamación o una afección relacionada con ella.

La presente descripción se refiere también al uso de cualquiera de los microorganismos aislados, biomásas o aceites microbianos de la invención o mezclas de los mismos, para uso en el tratamiento de inflamación o una afección relacionada con ella.

- 55 La presente descripción se refiere también a cualquiera de los microorganismos aislados, biomásas o aceites microbianos de la invención o mezclas de los mismos, para uso en el tratamiento de inflamación o una afección

relacionada con ella.

La presente descripción se refiere también a un método para tratar la inflamación o una afección relacionada con ella en un individuo con necesidad del mismo, que comprende administrar al individuo cualquiera de los microorganismos aislados, biomasas o aceites microbianos de la invención o mezclas de los mismos y un portador farmacéuticamente aceptable.

### Descripción detallada de la invención

Así, la presente invención se refiere a un aceite microbiano como se define en la reivindicación 1. Además, la presente descripción se refiere a microorganismos traustóquitridos aislados, así como cepas y mutantes de los mismos, así como biomasas, aceites microbianos, composiciones y cultivos de los mismos. La presente invención se refiere también a métodos para producir aceites microbianos de los traustóquitridos de la descripción y métodos para usar los aceites microbianos. Los traustóquitridos descritos en la presente memoria son altamente productivos cuando se compara con aislados previos y producen perfiles únicos de ácidos grasos, caracterizados en parte por altos niveles de ácidos grasos omega-3, en particular altos niveles de DHA.

### Microorganismos traustóquitridos

La descripción se refiere a traustóquitridos aislados, incluyendo mutantes, recombinantes y variantes de los mismos.

En algunas realizaciones, la descripción se refiere a un traustóquitrido de las especies depositadas con el N° de Acceso ATCC PTA-9695. El traustóquitrido aislado también se conoce en la presente memoria como *Schizochytrium* sp. ATCC PTA-9695. El traustóquitrido asociado al N° de Acceso ATCC PTA-9695 se depositó bajo el Tratado de Budapest el 7 de enero de 2.009 en la colección americana de cultivos tipo, Depósito de patente, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209.

En algunas realizaciones, la descripción se refiere a una cepa de traustóquitrido aislada depositada con el N° de Acceso ATCC PTA-9695. En algunas realizaciones, la descripción se refiere a un microorganismo de traustóquitrido aislado de la misma especie que el traustóquitrido depositado con el N° de Acceso ATCC PTA-9695.

En algunas realizaciones, la descripción se refiere a un traustóquitrido aislado con las características de las especies depositadas con el N° de Acceso ATCC PTA-9695 o una cepa procedente de ahí. Las características de la especie de traustóquitrido depositada con el N° de Acceso ATCC PTA-9695 incluyen su crecimiento y propiedades fenotípicas (los ejemplos de propiedades fenotípicas incluyen propiedades morfológicas y reproductivas), sus propiedades físicas y químicas (tales como pesos secos y perfiles lipídicos) y sus secuencias génicas. En algunas realizaciones, los traustóquitridos aislados de la descripción presentan sustancialmente idénticas propiedades fenotípicas a las del traustóquitrido depositado con el N° de Acceso ATCC PTA-9695. En algunas realizaciones, los traustóquitridos aislados de la descripción presentan sustancialmente idénticas propiedades de crecimiento del traustóquitrido depositado con el N° de Acceso ATCC PTA-9695.

En algunas realizaciones, la descripción se refiere a un mutante, variante o recombinante de un traustóquitrido aislado de la descripción, en el que los ácidos grasos totales producidos por el mutante, variante o recombinante comprenden aproximadamente 10% o menos en peso de ácido eicosapentaenoico. Se pueden producir cepas mutantes por procedimientos conocidos. Los procedimientos comunes incluyen irradiación; tratamiento a altas temperaturas y tratamiento con un mutágeno. Las cepas variantes pueden ser otros aislados que se encuentren en la naturaleza y/o subaislados de las especies descritas en la presente memoria. Se pueden producir cepas recombinantes por cualquier método conocido en biología molecular para la expresión de genes exógenos o la modificación de la función o expresión de los genes endógenos. En algunas realizaciones, la cepa mutante, variante o recombinante produce una mayor cantidad de ácidos grasos omega-3, incluyendo DHA y/o EPA, que la cepa natural. En algunas realizaciones, la cepa mutante, variante o recombinante produce una menor cantidad de uno o más ácidos grasos, tales como menores cantidades de EPA, ARA, DPA n-6 o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la cepa mutante, variante o recombinante produce un peso de células seco mayor por otro de cultivo que la cepa natural. Dichas cepas mutantes, variantes o recombinantes son ejemplos de cepas procedentes de un traustóquitrido aislado de la descripción.

En algunas realizaciones, la descripción se refiere a una cepa mutante del traustóquitrido depositado con el N° de Acceso ATCC PTA-9695. En más realizaciones, la cepa mutante es una cepa depositada con los Nos. de Acceso ATCC PTA-9696, PTA-9697 o PTA-9698. Las cepas de traustóquitrido asociadas a los Nos. de Acceso ATCC PTA-9696, PTA-9697 y PTA-9698 se depositaron bajo el Tratado de Budapest el 7 de enero de 2.009 en la Colección americana de cultivos tipo, Depósito de patente, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209. Estas cepas mutantes depositadas son derivados del traustóquitrido depositado con el N° de Acceso ATCC PTA-9695.

En algunas realizaciones, un traustóquitrido aislado de la descripción, incluyendo mutantes, variantes o recombinantes del mismo, comprende un perfil de ácidos grasos en una o más fracciones aisladas del traustóquitrido. La fracción o las fracciones aisladas del traustóquitrido incluyen la fracción de ácidos grasos total, la fracción de ésteres de esterol, la fracción de triglicéridos, la fracción de ácidos grasos libres, la fracción de esteroides, la fracción de diglicéridos, la fracción polar (incluyendo la fracción de fosfolípidos) y combinaciones de los mismos.

Cultivos de traustokuítridos y biomasas de traustokuítridos aisladas.

5 La descripción se refiere además a un cultivo que comprende uno o más traustokuítridos aislados de la descripción. Se conocen en la técnica varios parámetros de fermentación para inoculación, crecimiento y recuperación de microflora, tal como se describe en la Patente de EE.UU. N° 5.130.242. Se puede usar cualquier medio convencional para crecimiento de los traustokuítridos. Los medios líquidos o sólidos pueden contener agua marina natural o artificial. Las fuentes de carbono incluyen, pero no se limitan a, glucosa, fructosa, xilosa, sacarosa, maltosa, almidón soluble, molasas, fucosa, glucosamina, dextrano, grasas, aceites, glicerol, acetato de sodio y manitol. Las fuentes de nitrógeno incluyen, pero no se limitan a, peptona, extracto de levadura, polipeptona, extracto de malta, extracto de carne, casaminoácido, agua empleada para remojar el maíz, fuentes de nitrógeno orgánico, glutamato sódico, urea, 10 fuentes de nitrógeno inorgánico, acetato de amonio, sulfato de amonio, cloruro de amonio, nitrato de amonio, sulfato de sodio. Se muestra un medio típico en la Tabla 1:

Tabla 1: Medios de recipiente

Ingrediente	concentración		intervalos
NaCl	g/l	12,5	0-25, 5-20 ó 10-15
KCl	g/l	1,0	0-5, 0,25-3 ó 0,5-2
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	g/l	5,0	0-10, 2-8 ó 3-6
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	g/l	0,6	0-10, 0,25-5 ó 0,5-3
CaCl <sub>2</sub>	g/l	0,29	0,1-5, 0,15-3 ó 0,2-1
T 154 (extracto de levadura)	g/l	6,0	0-20, 1-15 ó 5-10
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	g/l	1,2	0,1-10, 0,5-5 ó 1-3
postautoclave (metales)			
Ácido cítrico	mg/l	3,5	0,1-100, 1-50 ó 2-25
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	mg/l	10,30	0,1-100, 1-50 ó 5-25
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	mg/l	3,10	0,1-100, 1-50 ó 2-25
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	mg/l	3,10	0,1-100, 1-50 ó 2-25
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	mg/l	0,04	0,001-1, 0,005-0,5 ó 0,01-0,1
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	mg/l	0,04	0,001-1, 0,005-0,5 ó 0,01-0,1
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	mg/l	2,07	0,1-100, 0,5-50 ó 1-25
NiSO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O	mg/l	2,07	0,1-100, 0,5-50 ó 1-25
postautoclave (vitaminas)			
Tiamina**	mg/l	9,75	0,1-100, 1-50 ó 5-25

## ES 2 602 121 T3

Ingrediente	concentración		intervalos
Vitamina B12**	mg/l	0,16	0,1-100, 0,1-10 ó 0,1-1
Ca <sup>1/2</sup> -pantotenato**	mg/l	3,33	0,1-100, 0,1-50 ó 1-10
postautoclave (carbono)			
Glucosa	g/l	30,0	5-150, 10-100 ó 20-50

Alimentación de nitrógeno:

Ingrediente	Concentración	
NH <sub>4</sub> OH	ml/l 21,6	0-150, 10-100 ó 15-50

Las condiciones típicas de cultivo incluirían lo siguiente:

pH	aproximadamente 6,5 - aproximadamente 8,5, aproximadamente 6,5 - aproximadamente 8,0, o aproximadamente 7,0 - aproximadamente 7,5
temperatura:	aproximadamente 17 - aproximadamente 30 grados Celsius, aproximadamente 20 - aproximadamente 25 grados Celsius o aproximadamente 22 a aproximadamente 23 grados Celsius
oxígeno disuelto:	saturación de aproximadamente 5 - aproximadamente 100%, saturación de aproximadamente 10 - aproximadamente 80% o saturación de aproximadamente 20 - aproximadamente 50%
glucosa controlada @:	aproximadamente 5 - aproximadamente 50 g/l, aproximadamente 10 - aproximadamente 40 g/l o aproximadamente 20 - aproximadamente 35 g/l.

- 5 En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80% o al menos aproximadamente 90% de oxígeno disuelto, como un porcentaje de nivel de saturación. En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende
- 10 aproximadamente 5% a aproximadamente 20%, aproximadamente 5% a aproximadamente 50%, aproximadamente 5% a aproximadamente 100%, aproximadamente 10% a aproximadamente 20%, aproximadamente 10% a aproximadamente 50%, aproximadamente 10% a aproximadamente 100%, aproximadamente 20% a aproximadamente 50% o aproximadamente 20% a aproximadamente 100% de oxígeno disuelto, como un porcentaje de nivel de saturación.
- 15 La descripción se refiere además a una biomasa aislada de un traustóquitrido de la descripción. Una biomasa de traustóquitrido aislada de la descripción es una biomasa celular recogida obtenida por cualquier método convencional para el aislamiento de una biomasa de traustóquitrido, tal como se describe en la Patente de EE.UU. N° 5.130.242 y la Publ. de Patente de EE.UU. N° 2002/0001833.
- 20 En algunas realizaciones, el peso de células seco de la biomasa aislada de cada litro de cultivo es al menos aproximadamente 50 g, al menos aproximadamente 60 g, al menos aproximadamente 70 g, al menos aproximadamente 80 g, al menos aproximadamente 100 g, al menos aproximadamente 120 g, al menos aproximadamente 140 g, al menos aproximadamente 160 g, al menos aproximadamente 180 g o al menos aproximadamente 200 g después de cultivo durante aproximadamente 7 días a aproximadamente 17°C a aproximadamente 30°C en un medio de cultivo de aproximadamente pH 6,5 a aproximadamente 8,5 que comprende
- 25 fuentes de carbono, nitrógeno y nutrientes y aproximadamente 950 ppm a aproximadamente 8.500 ppm de iones cloruro. En algunas realizaciones, el peso de células seco de la biomasa aislada de cada litro de cultivo es al menos aproximadamente 50 g, al menos aproximadamente 60 g, al menos aproximadamente 70 g, al menos aproximadamente 80 g, al menos aproximadamente 100 g, al menos aproximadamente 120 g, al menos aproximadamente 140 g, al menos aproximadamente 160 g, al menos aproximadamente 180 g o al menos

aproximadamente 200 g después de cultivo durante aproximadamente 7 días a aproximadamente 17°C, a aproximadamente 18°C, a aproximadamente 19°C, a aproximadamente 20°C, a aproximadamente 21°C, a aproximadamente 22°C, a aproximadamente 23°C, a aproximadamente 24°C, a aproximadamente 25°C, a aproximadamente 26°C, a aproximadamente 27°C, a aproximadamente 28°C, a aproximadamente 29°C o a aproximadamente 30°C en un medio de cultivo de aproximadamente pH 6,5, aproximadamente pH 7, aproximadamente pH 7,5, aproximadamente pH 8,0 o aproximadamente pH 8,5 que comprende fuentes de carbono, nitrógeno y nutrientes y aproximadamente 950 ppm a aproximadamente 8.500 ppm de iones cloruro. En algunas realizaciones, el peso de células seco de la biomasa aislada de cada litro de cultivo es de aproximadamente 50 g a aproximadamente 200 g después de cultivo durante aproximadamente 7 días a aproximadamente 17°C a aproximadamente 30°C en un medio de cultivo de aproximadamente pH 6,5 a aproximadamente pH 8,5 que comprende fuentes de carbono, nitrógeno y nutrientes y aproximadamente 950 ppm a aproximadamente 8.500 ppm de iones cloruro. En algunas realizaciones, el peso de células seco de la biomasa aislada de cada litro de cultivo es de aproximadamente 50 g a aproximadamente 200 g después de cultivo durante aproximadamente 7 días a aproximadamente 17°C, a aproximadamente 18°C, a aproximadamente 19°C, a aproximadamente 20°C, a aproximadamente 21°C, a aproximadamente 22°C, a aproximadamente 23°C, a aproximadamente 24°C, a aproximadamente 25°C, a aproximadamente 26°C, a aproximadamente 27°C, a aproximadamente 28°C, a aproximadamente 29°C o a aproximadamente 30°C en un medio de cultivo de aproximadamente pH 6,5, aproximadamente pH 7, aproximadamente pH 7,5, aproximadamente pH 8,0 o aproximadamente pH 8,5 que comprende fuentes de carbono, nitrógeno y nutrientes y aproximadamente 950 ppm a aproximadamente 8.500 ppm de iones cloruro.

En algunas realizaciones, el cultivo de traustóquitrido aislado presenta una productividad de ácidos grasos omega-3 de al menos aproximadamente 2 g/l/día, al menos aproximadamente 4 g/l/día o al menos aproximadamente 8 g/l/día después de cultivo durante aproximadamente 7 días a aproximadamente 17°C a aproximadamente 30°C en un medio de cultivo de aproximadamente pH 6,5 a aproximadamente pH 8,5 que comprende fuentes de carbono, nitrógeno y nutrientes y aproximadamente 950 ppm a aproximadamente 8.500 ppm de iones cloruro. En algunas realizaciones, el cultivo de traustóquitrido aislado presenta una productividad de ácidos grasos omega-3 de entre aproximadamente 1 g/l/día a aproximadamente 20 g/l/día, aproximadamente 2 g/l/día a aproximadamente 15 g/l/día, aproximadamente 2 g/l/día a aproximadamente 10 g/l/día, aproximadamente 3 g/l/día a aproximadamente 10 g/l/día o aproximadamente 4 g/l/día a aproximadamente 9 g/l/día, después de cultivo durante aproximadamente 7 días a aproximadamente 17°C a aproximadamente 30°C en un medio de cultivo de aproximadamente pH 6,5 a aproximadamente pH 8,5 que comprende fuentes de carbono, nitrógeno y nutrientes y aproximadamente 950 ppm a aproximadamente 8.500 ppm de iones cloruro.

En algunas realizaciones, el volumen de fermentación (volumen de cultivo) es al menos aproximadamente 2 litros, al menos aproximadamente 10 litros, al menos aproximadamente 50 litros, al menos aproximadamente 100 litros, al menos aproximadamente 200 litros, al menos aproximadamente 500 litros, al menos aproximadamente 1.000 litros, al menos aproximadamente 10.000 litros, al menos aproximadamente 20.000 litros, al menos aproximadamente 50.000 litros, al menos aproximadamente 100.000 litros, al menos aproximadamente 150.000 litros, al menos aproximadamente 200.000 litros o al menos aproximadamente 250.000 litros. En algunas realizaciones, el volumen de fermentación es aproximadamente 2 litros a aproximadamente 300.000 litros, aproximadamente 2 litros, aproximadamente 10 litros, aproximadamente 50 litros, aproximadamente 100 litros, aproximadamente 200 litros, aproximadamente 500 litros, aproximadamente 1.000 litros, aproximadamente 10.000 litros, aproximadamente 20.000 litros, aproximadamente 50.000 litros, aproximadamente 100.000 litros, aproximadamente 150.000 litros, aproximadamente 200.000 litros, aproximadamente 250.000 litros o aproximadamente 300.000 litros.

En algunas realizaciones, la descripción se refiere a una biomasa de traustóquitridos aislada que comprende un perfil de ácidos grasos de la descripción. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70% o al menos aproximadamente 80% del peso de células seco de la biomasa son ácidos grasos. En algunas realizaciones, más de aproximadamente 50%, más de aproximadamente 55% o más de aproximadamente 60% del peso de células seco de la biomasa son ácidos grasos. En algunas realizaciones, de aproximadamente 50% a aproximadamente 60%, aproximadamente 50% a aproximadamente 70%, aproximadamente 50% a aproximadamente 80%, aproximadamente 55% a aproximadamente 70%, aproximadamente 55% a aproximadamente 80%, aproximadamente 60% a aproximadamente 70% o aproximadamente 60% a aproximadamente 80% en peso del peso de células seco de la biomasa son ácidos grasos. En algunas realizaciones, la biomasa comprende al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70% o al menos aproximadamente 80% en peso de los ácidos grasos como ácidos grasos omega-3. En algunas realizaciones, la biomasa comprende de aproximadamente 50% a aproximadamente 60%, aproximadamente 50% a aproximadamente 70%, aproximadamente 50% a aproximadamente 80% en peso de los ácidos grasos como ácidos grasos omega-3. En algunas realizaciones, la biomasa comprende al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75% o al menos aproximadamente 80% en peso de los ácidos grasos como DHA. En algunas realizaciones, la biomasa comprende de aproximadamente 50% a aproximadamente 60%, aproximadamente 50% a aproximadamente 70% o aproximadamente 50% a aproximadamente 80% en peso de los ácidos grasos como DHA. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 30%, al menos



aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50% o al menos aproximadamente 60% en peso del peso de células seco de la biomasa es ácido docosahexaenoico. En algunas realizaciones, aproximadamente 25% a aproximadamente 65%, aproximadamente 25% a aproximadamente 50%, aproximadamente 30% a aproximadamente 40% o aproximadamente 25% a aproximadamente 35% en peso del peso de células seco de la biomasa es ácido docosahexaenoico. En algunas realizaciones, la biomasa comprende aproximadamente 10% o menos, aproximadamente 9% o menos, aproximadamente 8% o menos, aproximadamente 7% o menos, aproximadamente 6% o menos, aproximadamente 5% o menos, aproximadamente 4% o menos, aproximadamente 3% o menos, aproximadamente 2% o menos o aproximadamente 1% o menos en peso de los ácidos grasos como EPA. En algunas realizaciones, la biomasa comprende de aproximadamente 1% a aproximadamente 10%, aproximadamente 1% a aproximadamente 5%, aproximadamente 2% a aproximadamente 5%, aproximadamente 3% a aproximadamente 5% o aproximadamente 3% a aproximadamente 10% en peso de los ácidos grasos como EPA. En algunas realizaciones, la biomasa está sustancialmente exenta de EPA. En algunas realizaciones, la biomasa comprende una relación en peso de DHA a EPA de al menos aproximadamente 5:1, al menos aproximadamente 7:1, al menos aproximadamente 10:1, al menos aproximadamente 11:1, al menos aproximadamente 14:1, al menos aproximadamente 15:1, al menos aproximadamente 17:1, al menos aproximadamente 20:1, al menos aproximadamente 25:1, al menos aproximadamente 50:1 o al menos aproximadamente 100:1, en la que la biomasa comprende aproximadamente 10% o menos en peso de los ácidos grasos como EPA. En algunas realizaciones, la biomasa comprende de aproximadamente 0,1% a 0,2%, aproximadamente 0,1% a aproximadamente 0,3%, aproximadamente 0,1% a aproximadamente 0,4%, aproximadamente 0,1% a aproximadamente 0,5% o aproximadamente 0,1% a aproximadamente 1,5% en peso de los ácidos grasos como ARA. En algunas realizaciones, la biomasa comprende aproximadamente 1,5% o menos, aproximadamente 1% o menos, aproximadamente 0,5% o menos, aproximadamente 0,4% o menos, aproximadamente 0,3% o menos, aproximadamente 0,2% o menos o aproximadamente 0,1% o menos en peso de los ácidos grasos como ARA. En algunas realizaciones, la biomasa está sustancialmente exenta de ARA. En algunas realizaciones, la biomasa comprende una relación en peso de DHA a ARA de al menos aproximadamente 20:1, al menos aproximadamente 40:1, al menos aproximadamente 60:1, al menos aproximadamente 80:1, al menos aproximadamente 100:1, al menos aproximadamente 150:1, al menos aproximadamente 200:1, al menos aproximadamente 250:1 o al menos aproximadamente 300:1. En algunas realizaciones, la biomasa comprende de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 1%, aproximadamente 0,5% a aproximadamente 2%, aproximadamente 0,5% a aproximadamente 5%, aproximadamente 0,5% a aproximadamente 6%, aproximadamente 1% a aproximadamente 5%, aproximadamente 1% a aproximadamente 6%, aproximadamente 2% a aproximadamente 5% o aproximadamente 2% a aproximadamente 6% en peso de los ácidos grasos como DPA n-6. En algunas realizaciones, la biomasa comprende aproximadamente 6% o menos, aproximadamente 5% o menos, aproximadamente 2% o menos, aproximadamente 1% o menos o aproximadamente 0,5% o menos en peso de los ácidos grasos como DPA n-6. En algunas realizaciones, la biomasa está sustancialmente exenta de DPA n-6. En algunas realizaciones, la biomasa comprende una relación en peso de DHA a DPA n-6 de mayor que aproximadamente 6:1, al menos aproximadamente 8:1, al menos aproximadamente 10:1, al menos aproximadamente 15:1, al menos aproximadamente 20:1, al menos aproximadamente 25:1, al menos aproximadamente 50:1 o al menos aproximadamente 100:1. En algunas realizaciones, la biomasa comprende ácidos grasos con aproximadamente 5% o menos, aproximadamente 4% o menos, aproximadamente 3% o menos o aproximadamente 2% o menos en peso cada uno de ácido linoleico (18:2 n-6), ácido linoléico (18:3 n-3), ácido eicosenoico (20:1 n-9) y ácido erúxico (22:1 n-9).

Las características de una biomasa aislada de la descripción se asocian a propiedades endógenas o naturales de la biomasa aislada en vez de materiales introducidos de manera exógena.

#### 45 **Aceites microbianos**

La presente descripción se refiere además a métodos para producir aceites microbianos. En algunas realizaciones, el método comprende cultivar un traustóquitrido de la descripción en un cultivo para producir una biomasa y extraer un aceite que comprende ácidos grasos omega-3 de la biomasa. El aceite puede extraerse de una biomasa recién recogida o puede extraerse de una biomasa recogida previamente que se haya almacenado en condiciones que eviten el deterioro. Se pueden usar métodos conocidos para cultivar un traustóquitrido de la descripción, aislar una biomasa del cultivo, extraer un aceite microbiano de la biomasa y analizar el perfil de ácidos grasos de los aceites extraídos de la biomasa. Véase, por ej., la Patente de EE.UU. N° 5.130.242.

La invención se refiere además a un aceite microbiano que comprende un perfil de ácidos grasos de la invención. Un aceite microbiano de la invención puede ser cualquier aceite procedente de un microorganismo, incluyendo, por ejemplo: Un aceite bruto extraído de la biomasa del microorganismo sin tratamiento adicional; un aceite refinado que se obtiene por tratamiento de un aceite microbiano bruto con etapas de tratamiento adicionales tales como refinado, blanqueamiento y/o desodorización; un aceite microbiano diluido obtenido por dilución de un aceite microbiano bruto o refinado o un aceite enriquecido que se obtiene, por ejemplo, por tratamiento de un aceite microbiano bruto o refinado con métodos adicionales de purificación para aumentar la concentración de un ácido graso (tal como DHA) en el aceite.

En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de ésteres de esteroles de aproximadamente

0%, al menos aproximadamente 0,1%, al menos aproximadamente 0,2%, al menos aproximadamente 0,5%, al menos aproximadamente 1%, al menos aproximadamente 1,5%, al menos aproximadamente 2% o al menos aproximadamente 5% en peso. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de ésteres de esteroles de desde aproximadamente 0% a aproximadamente 1,5%, aproximadamente 0% a aproximadamente 2%, aproximadamente 0% a aproximadamente 5%, aproximadamente 1% a aproximadamente 1,5%, aproximadamente 0,2% a aproximadamente 1,5%, aproximadamente 0,2% a aproximadamente 2% o aproximadamente 0,2% a aproximadamente 5% en peso. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de ésteres de esteroles menor que aproximadamente 5%, menor que aproximadamente 4%, menor que aproximadamente 3% o menor que aproximadamente 2% en peso. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de triglicéridos de al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85% o al menos aproximadamente 90% en peso. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de triglicéridos de desde aproximadamente 65% a aproximadamente 95%, aproximadamente 75% a aproximadamente 95% o aproximadamente 80% a aproximadamente 95% en peso o aproximadamente 97% en peso o aproximadamente 98% en peso. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de ácidos grasos libres de al menos aproximadamente 0,5%, al menos aproximadamente 1%, al menos aproximadamente 1,5%, al menos aproximadamente 2%, al menos aproximadamente 2,5% o al menos aproximadamente 5% en peso. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de ácidos grasos libres de desde aproximadamente 0,5% a aproximadamente 5%, aproximadamente 0,5% a aproximadamente 2,5%, aproximadamente 0,5% a aproximadamente 2%, aproximadamente 0,5% a aproximadamente 1,5%, aproximadamente 0,5% a aproximadamente 1%, aproximadamente 1% a aproximadamente 2,5%, aproximadamente 1% a aproximadamente 5%, aproximadamente 1,5% a aproximadamente 2,5%, aproximadamente 2% a aproximadamente 2,5% o aproximadamente 2% a aproximadamente 5% en peso. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de ácidos grasos libres menor que aproximadamente 5%, menor que aproximadamente 4%, menor que aproximadamente 3%, menor que aproximadamente 2% o menor que aproximadamente 1% en peso. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de esteroides de al menos aproximadamente 0,5%, al menos aproximadamente 1%, al menos aproximadamente 1,5%, al menos aproximadamente 2% o al menos aproximadamente 5% en peso. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de esteroides de desde aproximadamente 0,5% a aproximadamente 1,5%, aproximadamente 1% a aproximadamente 1,5%, aproximadamente 0,5% a aproximadamente 2%, aproximadamente 0,5% a aproximadamente 5%, aproximadamente 1% a aproximadamente 2% o aproximadamente 1% a aproximadamente 5% en peso. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de esteroides menor que aproximadamente 5%, menor que aproximadamente 4%, menor que aproximadamente 3%, menor que aproximadamente 2% o menor que aproximadamente 1% en peso. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de diglicéridos de al menos aproximadamente 1,5%, al menos aproximadamente 2%, al menos aproximadamente 2,5%, al menos aproximadamente 3%, al menos aproximadamente 3,5% o al menos aproximadamente 5% en peso. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de diglicéridos de desde aproximadamente 1,5% a aproximadamente 3%, aproximadamente 2% a aproximadamente 3%, aproximadamente 1,5% a aproximadamente 3,5%, aproximadamente 1,5% a aproximadamente 5%, aproximadamente 2,5% a aproximadamente 3%, aproximadamente 2,5% a aproximadamente 3,5% o aproximadamente 2,5% a aproximadamente 5% en peso. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende insaponificables de menos de aproximadamente 2%, menos de aproximadamente 1,5%, menos de aproximadamente 1% o menos de aproximadamente 0,5% en peso del aceite. Las clases de lípidos presentes en el aceite microbiano, tal como la fracción de triglicéridos, pueden separarse por cromatografía por desorción súbita y analizarse por cromatografía de capa fina (TLC, por sus siglas en inglés) o separarse y analizarse por otros métodos conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones, el aceite microbiano y/o una o más fracciones del mismo seleccionadas de la fracción de triglicéridos, la fracción de ácidos grasos libres, la fracción de esteroides, la fracción de diglicéridos y combinaciones de las mismas, comprende al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 45%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75% o al menos aproximadamente 80% en peso de DHA. En algunas realizaciones, el aceite microbiano y/o una o más fracciones del mismo seleccionadas de la fracción de triglicéridos, la fracción de ácidos grasos libres, la fracción de esteroides, la fracción de diglicéridos y combinaciones de las mismas, comprende desde aproximadamente 40% a aproximadamente 45%, aproximadamente 40% a aproximadamente 50%, aproximadamente 40% a aproximadamente 60%, aproximadamente 50% a aproximadamente 60%, aproximadamente 55% a aproximadamente 60%, aproximadamente 40% a aproximadamente 65%, aproximadamente 50% a aproximadamente 65%, aproximadamente 55% a aproximadamente 65%, aproximadamente 40% a aproximadamente 70%, aproximadamente 40% a aproximadamente 80%, aproximadamente 50% a aproximadamente 80%, aproximadamente 55% a aproximadamente 80%, aproximadamente 60% a aproximadamente 80% o aproximadamente 70% a aproximadamente 80% en peso de DHA. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de ésteres de esteroles que comprende aproximadamente 45% o menos, aproximadamente 40% o menos, aproximadamente 35% o menos, aproximadamente 30% o menos, aproximadamente 25% o menos, aproximadamente 20% o menos, aproximadamente 15% o menos o aproximadamente 13% o menos en peso de DHA. En algunas realizaciones, el aceite microbiano y/o una o más fracciones del mismo seleccionadas de la fracción de triglicéridos, la fracción de ácidos grasos libres, la fracción de

esteroides, la fracción de diglicéridos y combinaciones de las mismas, comprende aproximadamente 10% o menos, aproximadamente 9% o menos, aproximadamente 8% o menos, aproximadamente 7% o menos, aproximadamente 6% o menos, aproximadamente 5% o menos, aproximadamente 4% o menos, aproximadamente 3% o menos, aproximadamente 2% o menos o aproximadamente 1% o menos en peso de EPA. En algunas realizaciones, el aceite microbiano y/o una o más fracciones del mismo seleccionadas de la fracción de triglicéridos, la fracción de ácidos grasos libres, la fracción de esteroides, la fracción de diglicéridos y combinaciones de las mismas, comprende desde aproximadamente 2% a aproximadamente 3%, aproximadamente 2% a aproximadamente 3,5%, aproximadamente 2,5% a aproximadamente 3,5%, aproximadamente 2% a aproximadamente 6%, aproximadamente 2,5% a aproximadamente 6%, aproximadamente 3,0% a aproximadamente 6%, aproximadamente 3,5% a aproximadamente 6%, aproximadamente 5% a aproximadamente 6% o aproximadamente 2% a aproximadamente 10% en peso de EPA. En algunas realizaciones, el aceite microbiano y/o una o más fracciones del mismo seleccionadas de la fracción de ésteres de esteroles, la fracción de triglicéridos, la fracción de ácidos grasos libres, la fracción de esteroides, la fracción de diglicéridos, la fracción polar (incluyendo la fracción de fosfolípidos) y combinaciones de las mismas, está sustancialmente exento de EPA. En algunas realizaciones, el aceite microbiano y/o una o más fracciones del mismo seleccionadas de la fracción de ésteres de esteroles, la fracción de triglicéridos, la fracción de ácidos grasos libres, la fracción de esteroides, la fracción de diglicéridos, la fracción polar (incluyendo la fracción de fosfolípidos) y combinaciones de las mismas, comprenden una relación en peso de DHA a EPA de al menos aproximadamente 5:1, al menos aproximadamente 7:1, al menos aproximadamente 9:1, al menos aproximadamente 10:1, al menos aproximadamente 15:1, al menos aproximadamente 20:1, al menos aproximadamente 25:1, al menos aproximadamente 30:1 o al menos aproximadamente 50:1, en la que el aceite microbiano y/o una o más fracciones del mismo comprende 10% o menos en peso de EPA. En algunas realizaciones, el aceite microbiano y/o una o más fracciones del mismo seleccionadas de la fracción de ésteres de esteroles, la fracción de triglicéridos, la fracción de ácidos grasos libres, la fracción de esteroides, la fracción de diglicéridos, la fracción polar (incluyendo la fracción de fosfolípidos) y combinaciones de las mismas, comprenden una relación en peso de DHA a EPA de al menos aproximadamente 5:1, pero menor que aproximadamente 20:1. En algunas realizaciones, la relación en peso de DHA a EPA es de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 18:1, de aproximadamente 7:1 a aproximadamente 16:1 o de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 15:1. En algunas realizaciones, el aceite microbiano y/o una o más fracciones del mismo seleccionadas de la fracción de ésteres de esteroles, la fracción de triglicéridos, la fracción de ácidos grasos libres, la fracción de esteroides, la fracción de diglicéridos, la fracción polar (incluyendo la fracción de fosfolípidos) y combinaciones de las mismas comprenden desde aproximadamente 0,1% a aproximadamente 0,25%, aproximadamente 0,2% a aproximadamente 0,25%, aproximadamente 0,1% a aproximadamente 0,5% o aproximadamente 0,1% a aproximadamente 1,5% en peso de ARA. En algunas realizaciones, el aceite microbiano y/o una o más fracciones del mismo seleccionadas de la fracción de ésteres de esteroles, la fracción de triglicéridos, la fracción de ácidos grasos libres, la fracción de esteroides, la fracción de diglicéridos, la fracción polar (incluyendo la fracción de fosfolípidos) y combinaciones de las mismas, comprenden aproximadamente 1,5% o menos, aproximadamente 1% o menos, aproximadamente 0,5% o menos, aproximadamente 0,2% o menos o aproximadamente 0,1% o menos en peso de ARA. En algunas realizaciones, el aceite microbiano y/o una o más fracciones del mismo seleccionadas de la fracción de ésteres de esteroles, la fracción de triglicéridos, la fracción de ácidos grasos libres, la fracción de esteroides, la fracción de diglicéridos, la fracción polar (incluyendo la fracción de fosfolípidos) y combinaciones de las mismas, están sustancialmente exentos de ARA. En algunas realizaciones, el aceite microbiano y/o una o más fracciones del mismo seleccionadas de la fracción de ésteres de esteroles, la fracción de triglicéridos, la fracción de ácidos grasos libres, la fracción de esteroides, la fracción de diglicéridos, la fracción polar (incluyendo la fracción de fosfolípidos) y combinaciones de las mismas, comprenden una relación en peso de DHA a ARA de al menos aproximadamente 20:1, al menos aproximadamente 30:1, al menos aproximadamente 35:1, al menos aproximadamente 40:1, al menos aproximadamente 60:1, al menos aproximadamente 80:1, al menos aproximadamente 100:1, al menos aproximadamente 150:1, al menos aproximadamente 200:1, al menos aproximadamente 250:1 o al menos aproximadamente 300:1. En algunas realizaciones, el aceite microbiano y/o una o más fracciones del mismo seleccionadas de la fracción de ésteres de esteroles, la fracción de triglicéridos, la fracción de ácidos grasos libres, la fracción de esteroides, la fracción de diglicéridos, la fracción polar (incluyendo la fracción de fosfolípidos) y combinaciones de las mismas, comprenden desde aproximadamente 0,5% a aproximadamente 1%, aproximadamente 0,5% a aproximadamente 2%, aproximadamente 0,5% a aproximadamente 2,5%, aproximadamente 0,5% a aproximadamente 3%, aproximadamente 0,5% a aproximadamente 3,5%, aproximadamente 0,5% a aproximadamente 5%, aproximadamente 0,5% a aproximadamente 6%, aproximadamente 1% a aproximadamente 2%, aproximadamente 2% a aproximadamente 3%, aproximadamente 2% a aproximadamente 3,5%, aproximadamente 1% a aproximadamente 3,5%, aproximadamente 1% a aproximadamente 3%, aproximadamente 1% a aproximadamente 3,5%, aproximadamente 1% a aproximadamente 6% en peso de DPA n-6. En algunas realizaciones, el aceite microbiano y/o una o más fracciones del mismo seleccionadas de la fracción de ésteres de esteroles, la fracción de triglicéridos, la fracción de ácidos grasos libres, la fracción de esteroides, la fracción de diglicéridos, la fracción polar (incluyendo la fracción de fosfolípidos) y combinaciones de las mismas, comprenden aproximadamente 6% o menos, aproximadamente 5% o menos, aproximadamente 3% o menos, aproximadamente 2,5% o menos, aproximadamente 2% o menos, aproximadamente 1% o menos o aproximadamente 0,5% o menos en peso de DPA n-6. En algunas realizaciones, el aceite microbiano y/o una o más fracciones del mismo seleccionadas de la fracción de ésteres de esteroles, la fracción de triglicéridos, la fracción de ácidos grasos libres, la fracción de esteroides, la fracción de diglicéridos, la fracción polar (incluyendo la fracción de fosfolípidos) y combinaciones de los mismos, están sustancialmente exentos de DPA n-6. En algunas realizaciones,

el aceite microbiano y/o una o más fracciones del mismo seleccionadas de la fracción de ésteres de esteroles, la fracción de triglicéridos, la fracción de ácidos grasos libres, la fracción de esteroides, la fracción de diglicéridos, la fracción polar (incluyendo la fracción de fosfolípidos) y combinaciones de las mismas, comprenden una relación en peso de DHA a DPA n-6 mayor que aproximadamente 6:1, al menos aproximadamente 8:1, al menos aproximadamente 10:1, al menos aproximadamente 15:1, al menos aproximadamente 20:1, al menos aproximadamente 25:1, al menos aproximadamente 50:1 o al menos aproximadamente 100:1. En algunas realizaciones, el aceite microbiano y/o una o más fracciones del mismo seleccionadas de la fracción de ésteres de esteroles, la fracción de triglicéridos, la fracción de ácidos grasos libres, la fracción de esteroides, la fracción de diglicéridos, la fracción polar (incluyendo la fracción de fosfolípidos) y combinaciones de las mismas, comprenden aproximadamente 5% o menos, aproximadamente 4% o menos, aproximadamente 3% o menos, aproximadamente 2% o menos, aproximadamente 1,5% o menos, aproximadamente 1% o menos o aproximadamente 0,5% o menos en peso de cada uno de ácido linoleico (18:2 n-6), ácido linolénico (18:3 n-3), ácido eicosenoico (20:1 n-9) y ácido erúxico (22:1 n-9). En algunas realizaciones, el aceite microbiano y/o una o más fracciones del mismo seleccionadas de la fracción de ésteres de esteroles, la fracción de triglicéridos, la fracción de ácidos grasos libres, la fracción de esteroides, la fracción de diglicéridos, la fracción polar (incluyendo la fracción de fosfolípidos) y combinaciones de las mismas, comprenden aproximadamente 5% o menos, aproximadamente 4% o menos, aproximadamente 3% o menos, aproximadamente 2% o menos, aproximadamente 1,5% o menos o aproximadamente 1% o menos en peso de ácido heptadecanoico (17:0). En algunas realizaciones, el aceite microbiano y/o una o más fracciones del mismo comprenden aproximadamente 0,01% a aproximadamente 5% en peso, aproximadamente 0,05% a aproximadamente 3% en peso o aproximadamente 0,1% a aproximadamente 1% en peso de ácido heptadecanoico.

La molécula de triglicérido contiene 3 átomos de carbono centrales ( $C_{sn-1}H_2R1-C_{sn-2}H_2R2-CS_{n-3}H_2R3$ ), que permite la formación de diferentes isómeros de posición. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de triglicéridos en la que al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 35% o al menos aproximadamente 40% de los triglicéridos en la fracción de triglicéridos contiene DHA en dos posiciones en el triglicérido (DHA disustituido) seleccionadas de dos cualesquiera de las posiciones *sn*-1, *sn*-2 y *sn*-3, basado en el porcentaje de área relativa de los picos en un cromatógrafo HPLC. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de triglicéridos en la que de aproximadamente 20% a aproximadamente 40%, aproximadamente 20% a aproximadamente 35%, aproximadamente 30% a aproximadamente 40% o aproximadamente 30% a aproximadamente 35% de los triglicéridos en la fracción de triglicéridos contiene DHA en dos posiciones en el triglicérido seleccionadas de dos cualesquiera de las posiciones *sn*-1, *sn*-2 o *sn*-3, basado en el porcentaje de área relativa de los picos en un cromatógrafo HPLC. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de triglicéridos en la que al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 15% o al menos aproximadamente 20% de los triglicéridos en la fracción de triglicéridos contiene DHA en todas las posiciones *sn*-1, *sn*-2 y *sn*-3 (DHA trisustituido), basado en el porcentaje de área relativa de los picos en un cromatógrafo HPLC. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de triglicéridos en la que de aproximadamente 5% a aproximadamente 20%, aproximadamente 5% a aproximadamente 15%, aproximadamente 10% a aproximadamente 20% o aproximadamente 10% a aproximadamente 15% de los triglicéridos en la fracción de triglicéridos contiene DHA en todas las posiciones *sn*-1, *sn*-2 y *sn*-3, basado en el porcentaje de área relativa de los picos en un cromatógrafo HPLC. Por el contrario, las especies TAG indicadas en la Patente de EE.UU. N° 6.582.941 no contienen DHA en las tres posiciones. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de triglicéridos en la que al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70% o al menos aproximadamente 75% de los triglicéridos en la fracción de triglicéridos contiene DHA en una posición en el triglicérido seleccionada de una cualquiera de las posiciones *sn*-1, *sn*-2 o *sn*-3, basado en el porcentaje de área relativa de los picos en un cromatógrafo HPLC. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de triglicéridos en la que de aproximadamente 50% a aproximadamente 75%, aproximadamente 50% a aproximadamente 70%, aproximadamente 50% a aproximadamente 65%, aproximadamente 60% a aproximadamente 75%, aproximadamente 60% a aproximadamente 70% o aproximadamente 60% a aproximadamente 65% de los triglicéridos en la fracción de triglicéridos contiene DHA en una posición en el triglicérido seleccionada de una cualquiera de las posiciones *sn*-1, *sn*-2 y *sn*-3, basado en el porcentaje de área relativa de los picos en un cromatógrafo HPLC.

#### Composiciones

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

Un aceite de traustoquítrido, biomasa o microbio de la invención se puede modificar o tratar más de manera química o de manera física basándose en los requerimientos de la composición por cualquier técnica conocida.

Las células o biomasa de traustoquítrido pueden secarse previamente a su uso en una composición por métodos que incluyen, pero no se limitan a, secado por congelación, secado al aire, secado por pulverización, secado en túnel, secado a vacío (liofilización) o un procedimiento similar. Alternativamente, se puede usar directamente una biomasa recogida y lavada en una composición sin secado. Véanse, por ej., las Patentes de EE.UU. Nos. 5.130.242 y 6.812.009.

Los aceites microbianos de la invención pueden usarse como material de partida para producir más eficazmente un producto enriquecido en un ácido graso tal como DHA. Por ejemplo, los aceites microbianos de la invención pueden someterse a varias 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 DHA u otro ácido graso. Los aceites microbianos de la invención pueden usarse también en reacciones químicas para producir compuestos procedentes de ácidos grasos en los aceites, tales como ésteres y sales de DHA u otro ácido graso.

Una composición de la invención puede incluir uno o más excipientes. Como se usa en la presente memoria, "excipiente" se refiere a un componente, o mezcla de componentes, que se usa en una composición de la presente invención para proporcionar las características deseables a la composición, incluyendo alimentos así como composiciones farmacéuticas, cosméticas e industriales. Un excipiente de la presente invención se puede describir 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 farmacéutica que es, dentro del alcance del buen criterio médico, adecuada para el contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otras complicaciones problemáticas por la duración deseada de contacto que corresponde a una relación beneficio/riesgo razonable. En algunas realizaciones, el término "farmacéuticamente aceptable" significa homologado por una agencia reguladora del gobierno federal o de un estado o enumerado en la Farmacopea de EE.UU. u otra farmacopea internacional reconocida en general para uso en animales y más en particular en seres humanos. Pueden usarse varios excipientes. En algunas realizaciones, el excipiente puede ser, pero no limitarse a, un agente alcalino, un estabilizante, 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 tampón, una carga, un emoliente o combinaciones de los mismos. Los excipientes además de los discutidos en la presente memoria pueden incluir excipientes enumerados en, aunque no limitados a, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 21<sup>a</sup> ed. (2.005). La inclusión de un excipiente en una clasificación particular en la presente memoria (por ej., "disolvente") se destina a ilustrar en vez de limitar la función del excipiente. Un excipiente particular puede encontrarse dentro de múltiples clasificaciones.

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

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 para animales o seres humanos. Los alimentos incluyen, pero no se limitan a, alimentos comunes; productos líquidos, incluyendo leches, bebidas, bebidas terapéuticas y bebidas nutricionales; alimentos funcionales; suplementos; nutracéuticos; fórmulas infantiles, incluyendo fórmulas para bebés prematuros; alimentos para mujeres embarazadas o madres lactantes; alimentos para adultos; alimentos geriátricos y alimentos para animales.

En algunas realizaciones, un aceite de traustoquítrido, biomasa o microbio de la invención puede usarse directamente como o incluido como un aditivo en uno o más de: un aceite, manteca, pasta para untar, otro ingrediente graso, bebida, salsa, alimento con base láctea o a base de soja (tal como leche, yogur, queso y helado), un producto de pastelería, un producto nutricional, por ej., como un suplemento nutricional (en forma de cápsula o comprimido), un suplemento vitamínico, un suplemento de la dieta, una bebida en polvo, un producto alimenticio en polvo acabado o semiacabado y combinaciones de los mismos.

Una lista parcial de composiciones alimenticias que puede incluir un aceite microbiano de la invención incluye, pero no se limita a, productos a base de soja (leches, helados, yogures, bebidas, cremas, pastas para untar, blanqueantes); sopas y mezclas para sopas; pastas, masas y productos alimenticios horneados incluyendo, por ejemplo, bollería fina, cereales de desayuno, pasteles, tartas de queso, empanadas, magdalenas, galletitas, barras, panes, rollos, galletas, panecillos, pastelitos, escones, costrones, crackers, dulces, pastelillos, empanadas, barras de granola/aperitivo y masas tostadas; caramelo y otra confitería; chicle; productos alimenticios líquidos, por ejemplo, leches, bebidas energéticas, fórmulas infantiles, bebidas carbonatadas, comidas líquidas, zumos de fruta, bebidas a base de fruta, bebidas a base de vegetales, jarabes multivitamínicos, sustitutos de comidas, alimentos medicinales y jarabes; mezclas para bebidas en polvo; pasta; productos de pescado elaborados; productos de carne elaborados; productos de aves elaborados; jugos y salsas; condimentos (salsa de tomate, mayonesa, etc.); pastas para untar a base de aceite vegetal; productos lácteos; yogur; mantequillas; productos lácteos helados; helados, postres helados; yogures helados; productos alimenticios semi-sólidos tales como alimentos para bebés; pudín y postres con gelatina; queso procesado y no procesado; mezclas para tortitas; barras alimenticias incluyendo barras energéticas; mezclas para gófres; aderezos para ensaladas; mezclas para sustitución de huevo; nuez y pastas para untar a base de nuez; refrigerios salados tales como patatas fritas, tortillas de maíz, refrigerios extruidos, palomitas, rosquillas, patatas fritas de bolsa y frutos secos; refrigerios artesanos tales como aderezos, refrigerios de fruta deshidratada, refrigerios de carne, cortezas de cerdo, barras de alimento saludable y pasteles de arroz/maíz.

En algunas realizaciones, puede usarse un aceite microbiano de la invención para enriquecer una fórmula infantil. Se puede enriquecer una fórmula infantil con un aceite microbiano de la invención sólo o junto con un aceite refinado físicamente procedente de un microorganismo que produce ácido araquidónico (ARA). Un microorganismo que produce ARA, por ejemplo, es *Mortierella alpina* o *Mortierella* sect. *schmuckeri*. Alternativamente, las fórmulas

infantiles pueden enriquecerse con un aceite microbiano de la invención junto con un aceite rico en ARA, incluyendo ARASCO® (Martek Biosciences, Columbia, MD).

5 En algunas realizaciones, la composición es un pienso animal. Un "animal" significa cualquier organismo no humano que pertenezca al reino Animalia e incluye, sin limitación, animales acuáticos y animales terrestres. El término "pienso animal" o "alimento para animales" se refiere a cualquier alimento destinado a animales no humanos, incluidos peces; peces comerciales; peces ornamentales; larvas de peces; bivalvos; moluscos; crustáceos; mariscos; camarón; larva de camarón; artemia; rotíferos; artemia; organismos filtrantes; anfibios; reptiles; mamíferos; animales domésticos; animales de granja; animales de zoológico; animales atletas; animales de cría; animales para las carreras; animales presentados a concursos; animales autóctonos; animales raros o en peligro de extinción; animales de compañía; animales mascota tales como perros, gatos, conejillos de indias, conejos, ratas, ratones o caballos; primates tales como monos (por ej., capuchino, rhesus, verde africano, patas, cangrejero y cercopiteco), simios, orangutanes, babuinos, gibones y chimpancés; cánidos tales como perros y lobos; felinos tales como gatos, leones y tigres; équidos tales como caballos, asnos y cebras; animales destinados a la alimentación tales como vacas, ganado, cerdos y ovejas; ungulados tales como ciervos y jirafas; roedores tales como ratones, ratas, hámster y conejillos de indias, etcétera. Un pienso animal incluye, pero no se limita a, un pienso para acuicultura, un pienso para animales domésticos incluyendo 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.

20 En algunas realizaciones, la composición es un pienso o suplemento para pienso para cualquier animal cuya carne o productos son consumidos por los seres humanos, tales como cualquier animal del que procede la carne, huevos o leche para consumo humano. Cuando se alimentan dichos animales, se pueden incorporar nutrientes tales como los LC-PUFA a la carne, leche, huevos u otros productos de dichos animales para aumentar su contenido en estos nutrientes.

25 En algunas realizaciones, la composición es un material liofilizado que puede ser desmenuzado para formar partículas de un tamaño apropiado para consumo por zooplancton, artemia o rotíferos y filtradores. En algunas realizaciones, el zooplancton, artemia o rotíferos alimentados por la composición son alimentados a su vez a larvas de pescado, peces, marisco, bivalvos o crustáceos.

30 En algunas realizaciones, la composición es una composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, una composición antiinflamatoria, un fármaco para tratamiento de cardiopatía coronaria, un fármaco para tratamiento de arteriosclerosis, un agente quimioterapéutico, un excipiente activo, un fármaco para la osteoporosis, un antidepresivo, un anticonvulsivo, un fármaco anti-*Helicobacter pylori*, un fármaco para tratamiento de enfermedad neurodegenerativa, un fármaco para tratamiento de enfermedad hepática degenerativa, un antibiótico, una composición para reducir el colesterol y una composición para reducir los triglicéridos. En algunas realizaciones, la composición es un alimento médico. Un alimento médico incluye un alimento que está en una composición que se tiene que consumir o administrar de manera externa bajo la supervisión de un médico y que está destinada al tratamiento dietético específico de una afección, para la que están establecidos los requerimientos nutricionales distintivos, basados en principios científicos reconocidos, por evaluación médica.

40 En algunas realizaciones, el aceite microbiano se puede formular en una forma farmacéutica. Las formas farmacéuticas pueden incluir, pero no se limitan a, comprimidos, cápsulas, sellos, bolitas, píldoras, polvos y gránulos y formas farmacéuticas parenterales, que incluyen, pero no se limitan a, disoluciones, suspensiones, emulsiones y polvos secos que comprenden una cantidad eficaz del aceite microbiano. También se conoce en la técnica que dichas formulaciones también pueden contener diluyentes, cargas, disgregantes, aglutinantes, lubricantes, tensioactivos, vehículos hidrófobos, vehículos solubles en agua, emulsionantes, tampones, humectantes, hidratantes, solubilizantes, conservantes y similares, farmacéuticamente aceptables. Las formas de administración pueden incluir, pero no se limitan a, comprimidos, grageas, cápsulas, pastillas y píldoras, que contienen el aceite microbiano y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables adecuados.

50 Para administración oral, se puede combinar el aceite microbiano con portadores farmacéuticamente aceptables conocidos en la técnica. Dichos portadores permiten que los aceites microbianos de la invención se formen como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones acuosas, suspensiones y similares, para ingestión oral por un individuo que se tenga que tratar. En algunas realizaciones, la forma farmacéutica es un comprimido, píldora o pastilla. Las preparaciones farmacéuticas para uso oral pueden obtenerse por adición de un excipiente sólido, moliendo opcionalmente la mezcla resultante y tratando la mezcla de gránulos, después de añadir coadyuvantes adecuados, si se desea, para obtener núcleos de comprimidos o grageas. Los excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, cargas tales como azúcares, incluyendo, pero no limitado a, lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, pero no limitado a, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes tales como, pero no limitado a, la polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido algínico o una sal del mismo tal como alginato de sodio. Las preparaciones farmacéuticas que se pueden usar por vía oral incluyen, pero no se limitan a, cápsulas de ajuste suave hechas de gelatina, así como 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, enjuagues, cremas faciales, acondicionadores, maquillajes, agentes para el baño y líquidos de dispersión. Los agentes cosméticos pueden ser medicinales o no medicinales.

- 5 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 fotosensible fotográfico; un detergente; un aceite industrial o un detergente industrial. Por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 7.259.006 describe el uso de grasa y aceite que contiene DHA para producción de ácido behénico y producción de materiales sensibles fotográficos usando ácido behénico.

#### 10 **Métodos para usar las composiciones.**

En algunas realizaciones, las composiciones pueden usarse en el tratamiento de una afección en seres humanos o animales.

- 15 Los términos "tratar" y "tratamiento" se refieren a tanto tratamiento terapéutico como medidas profilácticas o preventivas, en las que el objeto es prevenir o retardar (reducir) una afección, enfermedad o trastorno fisiológico no deseado u obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. Para los fines de esta descripción, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, alivio de los síntomas o signos asociados a una afección, enfermedad o trastorno; disminución de la extensión de una afección, enfermedad o trastorno; estabilización de una afección, enfermedad o trastorno (es decir, en el caso de que la afección, enfermedad o trastorno no esté empeorando); retardar el comienzo o el progreso de la afección, enfermedad o trastorno; alivio de la afección, enfermedad o trastorno; remisión (sea parcial o total y sea detectable o no detectable) de la afección, enfermedad o trastorno o intensificación o mejora de una afección, enfermedad o trastorno. El tratamiento incluye provocar una respuesta clínicamente significativa sin efectos secundarios excesivos. El tratamiento también incluye prolongar la supervivencia cuando se compara con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento.

- 25 En algunas realizaciones, la composición se usa para tratar una afección, enfermedad o trastorno tal como acné, inflamación aguda, maculopatía relacionada con la edad, alergia, artritis de Alzheimer, asma, aterosclerosis, enfermedad autoinmunitaria, trastorno lipídico en sangre, quistes mamarios, caquexia, cáncer, reestenosis cardíaca, enfermedades cardiovasculares, inflamación crónica, cardiopatía coronaria, fibrosis cística, trastorno degenerativo del hígado, diabetes, eczema, trastorno gastrointestinal, cardiopatía, niveles altos de triglicéridos, hipertensión, hiperactividad, enfermedades inmunológicas, inhibición de crecimiento de tumores, afecciones inflamatorias, trastornos intestinales, disfunción renal, leucemia, depresión mayor, esclerosis múltiple, trastorno neurodegenerativo, artrosis, osteoporosis, trastorno peroxisomal, preeclampsia, parto prematuro, soriasis, enfermedad pulmonar, artritis reumatoide, riesgo de cardiopatía o trombosis.

En algunas realizaciones, la composición se usa para aumentar la duración de la gestación en el tercer trimestre.

En algunas realizaciones, la composición se usa para controlar la presión sanguínea.

- 35 En algunas realizaciones, la composición se usa para mejorar o mantener la función cognitiva.

En algunas realizaciones, la composición se usa para mejorar mantener la memoria.

- 40 La composición o forma farmacéutica puede administrarse al cuerpo de un individuo por cualquier ruta compatible con la composición o forma farmacéutica. Se considera que se "administra" una sustancia si se introduce la sustancia en el cuerpo del individuo por el individuo, o si es otra persona, una máquina, o un dispositivo introduce la sustancia en el cuerpo del individuo. "Administrar" por lo tanto, incluye, por ej., autoadministración, administración por otros y administración indirecta. El término "continuo" o "consecutivo", como se usa en la presente memoria con referencia a "administración," significa que la frecuencia de administración es al menos una vez al día. Obsérvese, sin embargo, que la frecuencia de administración puede ser mayor de una vez al día y ser aún "continua" o "consecutiva", por ej., dos veces o incluso tres veces al día, siempre que no se excedan los niveles de dosificación como se especifica en la presente memoria. Los medios y métodos para administración son conocidos en la técnica y un trabajador puede referir varias referencias farmacológicas para guía. Por ejemplo, puede consultarse "Modern Pharmaceuticals," Banker & Rhodes, Informa Healthcare, USA, 4ª ed. (2.002) y "Goodman & Gilman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics," McGraw-Hill Companies, Inc., Nueva York, 10ª ed. (2.001).

- 50 Por "sujeto", "individuo" o "paciente" se quiere decir cualquier individuo, sea humano o no humano, para el cual se desea diagnóstico, pronóstico o tratamiento. Los sujetos mamíferos incluyen, pero no se limitan a, seres humanos; animales domésticos; animales de granja; animales de zoológico; animales atletas; animales mascota tales como perros, gatos, conejillos de indias, conejos, ratas, ratones o caballos; primates tales como monos (por ej., capuchino, rhesus, verde africano, patas, cangrejero y cercopiteco), simios, orangutanes, babuinos, gibones y chimpancés; cánidos tales como perros y lobos; felinos tales como gatos, leones y tigres; équidos tales como caballos, asnos y cebras; animales destinados a la alimentación tales como vacas, ganado, cerdos y ovejas; ungulados tales como ciervos y jirafas; roedores tales como ratones, ratas, hámster y conejillos de indias, etcétera. El término sujeto también incluye animales de modelo, por ejemplo, animales de modelo de enfermedades. En algunas realizaciones,

el término sujeto incluye animales valiosos, económicamente o de otro modo, por ejemplo, animales reproductores económicamente importantes, animales para las carreras, animales presentados a concursos, animales autóctonos, animales raros o en peligro de extinción o animales de compañía. En algunas realizaciones, el sujeto es un sujeto humano. En algunas realizaciones, el sujeto es un sujeto no humano.

- 5 La composición puede administrarse como una “cantidad terapéuticamente eficaz”, una “cantidad profilácticamente eficaz”, una “dosis terapéutica” o una “dosis profiláctica”. Una “cantidad terapéuticamente eficaz” o “dosis terapéutica” se refiere a una cantidad eficaz, a dosis y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir un resultado terapéutico deseado. Un resultado terapéutico puede ser, por ejemplo, atenuar los síntomas, supervivencia prolongada, movilidad mejorada y similares. Un resultado terapéutico no requiere que sea una “cura”. Una “cantidad profilácticamente eficaz” o “dosis profiláctica” se refiere a una cantidad eficaz, a dosis y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Típicamente, puesto que se usa una dosis profiláctica en sujetos previamente a, o en una fase más temprana de la enfermedad, una cantidad profilácticamente eficaz será menor que una cantidad terapéuticamente eficaz para tratamiento de una fase avanzada de la enfermedad.

- 15 Se pueden administrar varias cantidades de dosis de la composición farmacéutica a un sujeto, basándose en la cantidad de DHA u otro componente de ácido graso del traustoquítrido, biomasa o aceite microbiano que se tiene que administrar al sujeto. Los términos “dosis diaria”, “nivel de dosis diaria” y “cantidad de dosis diaria” se refieren en la presente memoria a la cantidad total de DHA u otro componente de ácido graso administrado al día (por periodo de 24 horas). Así, por ejemplo, la administración de DHA a un individuo a una dosis diaria de 2 mg significa que el individuo recibe un total de 2 mg de DHA sobre una base diaria, se administre DHA como una única forma farmacéutica que comprende 2 mg de DHA o alternativamente, cuatro formas farmacéuticas que comprenden 0,5 mg de DHA cada una (para un total de 2 mg de DHA). En algunas realizaciones, la cantidad diaria de DHA se administra en una sola forma farmacéutica o en dos formas farmacéuticas. Las formas farmacéuticas de la presente descripción pueden tomarse en una sola aplicación o en aplicaciones múltiples. Por ejemplo, si se toman cuatro comprimidos a diario, comprendiendo cada comprimido 0,5 mg de DHA, entonces los cuatro comprimidos se pueden tomar una vez al día o se pueden tomar 2 comprimidos dos veces al día o se puede tomar 1 comprimido cada 6 horas. En algunas realizaciones, la dosis diaria es de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 15 g de DHA. En algunas realizaciones, la dosis diaria es de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 250 mg, aproximadamente 100 mg a aproximadamente 500 mg, aproximadamente 100 mg a aproximadamente 1 g, aproximadamente 1 g a aproximadamente 2,5 g, aproximadamente 1 g a aproximadamente 5 g, aproximadamente 1 g a aproximadamente 10 g, aproximadamente 1 g a aproximadamente 15 g, aproximadamente 5 g a aproximadamente 10 g, aproximadamente 5 g a aproximadamente 15 g, aproximadamente 10 g a aproximadamente 15 g, aproximadamente 100 mg a aproximadamente 10 g, aproximadamente 100 mg a aproximadamente 5 g o aproximadamente 100 mg a aproximadamente 2,5 g.

- 35 La administración de las composiciones o las formas farmacéuticas de la presente descripción pueden conseguirse usando varios regímenes. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la administración tiene lugar a diario en días consecutivos o alternativamente tiene lugar cada dos días (bi-diario). La administración puede tener lugar en uno o más días.

- 40 La administración de las composiciones y formas farmacéuticas se puede combinar con otros regímenes usados para tratamiento de la afección. Por ejemplo, el método de la presente descripción puede combinarse con regímenes dietéticos (por ejemplo, dietas bajas en carbohidratos, dietas altas en proteína, dietas altas en fibra, etc.), regímenes de ejercicio, regímenes de peso bajo, regímenes de abandono del tabaquismo o combinaciones de los mismos. El método de la presente descripción también se puede usar junto con otros productos farmacéuticos en el tratamiento de la afección. Las composiciones o las formas farmacéuticas de la presente descripción pueden administrarse antes o después de otros regímenes o productos farmacéuticos.

- 45 Estuches que comprenden las composiciones

- La invención se refiere además a estuches o envases que contienen una o más unidades de una composición de la invención. Los estuches o envases pueden incluir unidades de un producto alimenticio, composición farmacéutica, cosmético o composición industrial que comprende el traustoquítrido, biomasa o aceite microbiano de la invención o combinaciones de los mismos para la preparación de un alimento, cosmético, composición farmacéutica o composición industrial.

- 50 En algunas realizaciones, el estuche o envase contiene una o más unidades de una composición farmacéutica que se tiene que administrar según los métodos de la presente descripción. El estuche o envase puede contener una unidad de dosificación o más de una unidad de dosificación (es decir, múltiples unidades de dosificación). Si hay múltiples unidades de dosificación en el estuche o envase, las múltiples unidades de dosificación pueden disponerse opcionalmente para administración secuencial.

- 55 Los estuches de la presente descripción pueden contener opcionalmente instrucciones asociadas a las unidades o formas de dosificación de los estuches. Tales instrucciones pueden estar en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regule la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos, cuya observación refleja la aprobación por la agencia de la fabricación, uso o venta para administración a seres humanos para tratar una



afección o trastorno. Las instrucciones pueden estar en cualquier forma que exprese información sobre el uso de las unidades o formas farmacéuticas en el estuche según los métodos de la descripción. Por ejemplo, las instrucciones pueden estar en la forma de materia impresa o en la forma de un dispositivo de medio prerregistrado.

5 Durante el examen de un paciente, un profesional médico puede determinar que la administración de uno de los métodos de la presente descripción sea 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 descripción. Previamente a prescribir cualquier régimen, el médico puede asesorar al paciente, por ejemplo, sobre los diversos riesgos y beneficios asociados al régimen. Se puede proporcionar al paciente una descripción completa de todos los riesgos conocidos y sospechados asociados al régimen. Dicho asesoramiento se puede proporcionar de manera verbal, así como en forma escrita. En algunas realizaciones, el médico puede proporcionar al paciente materiales bibliográficos sobre el régimen, tal como información del producto, materiales educativos y similares.

10 La presente descripción también se refiere a métodos para educar a los consumidores sobre los métodos de tratamiento, comprendiendo el método distribuir las formas farmacéuticas con información al consumidor en un punto de venta. En algunas realizaciones, la distribución tendrá lugar en un punto de venta con un farmacéutico o profesional de la salud.

15 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, sitio web para un representante de atención al cliente en directo. En algunas realizaciones, la información para el consumidor proporcionará direcciones para uso de las formas farmacéuticas según los métodos de la presente descripción, uso para la edad apropiada, indicación, contraindicaciones, dosificación apropiada, advertencias, número de teléfono de la dirección del sitio web. En algunas realizaciones, el método comprende además proporcionar información profesional a personas relevantes en una posición para contestar las preguntas del consumidor teniendo en cuenta el uso de los regímenes descritos según los métodos de la presente descripción. El término "información profesional" incluye, pero no se limita a, información acerca del régimen cuando se administra según los métodos de la presente descripción que se diseña para permitir que un profesional médico conteste las preguntas del consumidor.

20 Un "profesional médico" incluye, por ejemplo, un médico, auxiliar médico, enfermera especializada, farmacéutico y representante de atención al cliente.

Habiéndose descrito en general esta invención, se puede obtener más entendimiento por referencia a los ejemplos proporcionados en la presente memoria. Estos ejemplos son para fines ilustrativos sólo.

### 30 Ejemplo 1

El traustoquítrido aislado depositado con el N° de Acceso ATCC PTA-9695 se caracterizó por clasificación taxonómica.

35 Se recogieron muestras de hábitats entre mareas durante la marea baja. Se pusieron agua, sedimento, material vegetal vivo y restos vegetales/animales descompuestos en tubos de 50 ml estériles. Se extendieron porciones de cada muestra junto con el agua sobre placas de agar sólido de medio de aislamiento. El medio de aislamiento consistía en: 500 ml de agua de mar artificial, 500 ml de agua destilada, 1 g de glucosa, 1 g de glicerol, 13 g de agar, 1 g de glutamato, 0,5 g de extracto de levadura, 0,5 g hidrolizado de caseína, 1 ml de una disolución de vitaminas (100 mg/l de tiamina, 0,5 mg/l de biotina, 0,5 mg de B<sub>12</sub>), 1 ml de una disolución de mineral traza (metales PII, conteniendo por litro: 6,0 g de FeCl<sub>3</sub>6H<sub>2</sub>O, 6,84 g de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,86 g de MnCl<sub>2</sub>4H<sub>2</sub>O, 0,06 g de ZnCl<sub>2</sub>, 0,026 de CoCl<sub>2</sub>6H<sub>2</sub>O, 0,052 g de NiSO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O, 0,002 g de CuSO<sub>4</sub>5H<sub>2</sub>O y 0,005 g de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>2H<sub>2</sub>O) y 500 mg cada uno de penicilina G y sulfato de estreptomina. Se incubaron las placas de agar en la oscuridad a 20-25°C. Después de 2-4 días se examinaron las placas de agar con aumento y se recogieron colonias de células con un palillo estéril y se volvieron a sembrar en estrías sobre una placa fresca del medio. Se volvió a repetir la siembra en estrías de las células sobre medio fresco hasta que se eliminaron los organismos contaminados.

45 Se transfirieron colonias de placas de agar a placas de petri con agua de mar de media concentración y (1 ml) de una suspensión de larva de camarón de salmuera recién incubada en autoclave. La larva de camarón de salmuera llegó a multiplicarse intensamente con agrupaciones de esporangios después de 2-3 días. Las zoosporas se biflagelaron en el vertido, nadando activamente lejos del esporangio maduro, los restos de las paredes de los cuales son claramente visibles (en contraste de fase) después de la liberación de esporas. El esporangio midió 12,5 µm a 25 µm de diámetro y las zoosporas tuvieron 2,5 µm a 2,8 µm x 4,5 µm a 4,8 µm de tamaño. Hubo 8 a 24 esporas por esporangio individual. Las zoosporas sedimentadas se expandieron y experimentaron rápidamente divisiones binarias conduciendo a tétradas, octadas y finalmente a agrupaciones de esporangios. La formación de tétradas comenzó en una fase muy temprana previa a la madurez de los esporangios. Estas características están de acuerdo con el género *Schizochytrium*.

55 El traustoquítrido aislado depositado con el N° de Acceso ATCC PTA-9695 se caracterizó además basándose en la similitud de su gen de ARNr 18s al de especies conocidas. El ADN genómico total del traustoquítrido depositado con el N° de Acceso ATCC PTA-9695 se preparó por procedimientos clásicos (Sambrook J. y Rusell D. 2.001. Molecular

cloning: A laboratory manual, 3ª edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York) y Se usó para multiplicación PCR del gen de ARN 18s. La multiplicación PCR del gen de ARN 18s se llevó a cabo con cebadores descritos previamente (Honda et. al., J. Eukaryot. Microbiol. 46 (6) 1.999). Las condiciones PCR con plantilla de ADN cromosómico fueron como sigue: dNTPs 0,2 µM, 0,1 uM cada cebador, DMSO al 8%, 200 ng de ADN cromosómico, 2,5 U de II fusión HS ADN polimerasa PfuUltra® (Stratagene) y 1X tampón PfuUltra® (Stratagene) en un volumen total de 50 µl. El protocolo PCR incluyó las siguientes etapas: (1) 95°C durante 2 minutos; (2) 95°C durante 45 segundos; (3) 55°C durante 30 segundos; (4) 72°C durante 2 minutos; (5) 2-4 etapas repetidas durante 40 ciclos; (6) 72°C durante 5 minutos y (7) mantenido a 6°C.

La multiplicación PCR proporcionó un producto de ADN distinto con el tamaño esperado usando plantilla cromosómica descrita anteriormente. El producto PCR se clonó en el vector pJET1.2/blunt (Fermentas) según las instrucciones del fabricante y se determinó la secuencia de inserto usando cebadores clásicos suministrados.

La Tabla 2 muestra una comparación de la secuencia de ARNr 18s del traustóquitrído depositado con el N° de Acceso ATCC PTA-9695 a secuencias de ADN en la base de datos electrónica del Centro nacional para información de biotecnología (NCBI, por sus siglas en inglés). En resumen, se determinó el “% de identidad” por la matriz de calificación "swgapdnam" en el programa "AlignX" del programa VectorNTI (Invitrogen), un patrón para alineación de ADN. Se tomó el “% cobertura” de los resultados de un cálculo de la herramienta básica de búsqueda de alineamiento local (BLAST) de la base de datos electrónica del NCBI y es el porcentaje de la longitud buscada que se incluye en los segmentos alineados.

Tabla 2: Comparación de secuencias de ARNr 18s.

Traustóquitrídos	Cálculo % Identidad #1	Cálculo % Cobertura #2
<i>Thraustochytrium aggregatum</i> (p)	98	90
<i>Thraustochutriidae</i> sp. HU1	84	86
<i>Thraustochutriidae</i> sp. 8-7	84	91
<i>Thraustochytrium multirudimentale</i>	81	88
<i>Thraustochutriidae</i> sp. PW19	81	85
<i>Schizochytrium</i> sp. ATCC 20888	81	95
(p): indica secuencia parcial		

Como se muestra en la Tabla 2, se encontró que, en términos de % de identidad, la secuencia de genes de ARNr 18s (SEC ID N° 1) del traustóquitrído depositado con el N° de Acceso ATCC PTA-9695 está estrechamente relacionada, aunque no es idéntica, con la secuencia génica de ARNr 18s de *T. aggregatum* proporcionado en Honda, D. et al., J. Euk. Micro. 46 (6): 637-647 (1.999). La secuencia génica de ARNr 18s publicada para *Traustochytrium aggregatum* es una secuencia parcial con un hueco de aproximadamente 71 nucleótidos de ADN en el medio de la secuencia. En términos de porcentaje de cobertura, la secuencia génica de ARNr 18s del aislado de la descripción está más estrechamente relacionada con *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 que con *T. aggregatum*.

Las proteínas altamente conservadas tales como actina y beta-tubulina se han usado extensamente, junto con genes ARNr 18s, como marcadores para valorar las relaciones filogenéticas entre organismos (Baldauf, S. M. Am. Nat. 154, S178 (1.999)). El ADN genómico total del traustóquitrído depositado con el N° de Acceso ATCC PTA-9695 se usó también como una plantilla para multiplicación PCR de genes tanto de actina como de beta-tubulina. La multiplicación PCR se llevó a cabo con cebadores diseñados para regiones conservadas de las secuencias de ADN de actina y beta-tubulina de *T. aggregatum*.

Las condiciones PCR con plantillas de ADN cromosómico fueron como sigue: dNTPs 0,2 µM, cada cebador 0,1 uM, DMSO al 8%, 200 ng de ADN cromosómico, 2,5 U de II fusión ADN polimerasa Herculase® (Stratagene) y 1X tampón Herculase® (Stratagene) en un volumen total de 50 µl. El protocolo PCR incluyó las siguientes etapas: (1) 95°C durante 2 minutos; (2) 95°C durante 30 segundos; (3) 55°C durante 30 segundos; (4) 72°C durante 2 minutos; (5) 2-4 etapas repetidas durante 40 ciclos; (6) 72°C durante 5 minutos y (7) mantenido a 6°C.

La multiplicación PCR proporcionó productos de ADN distintos con los tamaños esperados usando plantilla cromosómica descrita anteriormente. Los productos PCR respectivos se clonaron en el vector pJET1.2/blunt

(Fermentas) según las instrucciones del fabricante y se determinó la secuencia de inserto de cada uno usando cebadores clásicos suministrados.

5 La Tabla 3 muestra identidades para la secuencia de aminoácidos de actina (SEC ID N° 3) del traustocuítrido depositado con el N° de Acceso ATCC PTA-9695 cuando se compara con secuencias de actina disponibles en la base de datos pública. Las identidades se determinaron por el uso de la matriz de clasificación "blosum62mt2" en el programa "AlignX" del programa VectorNTI, un patrón para alineamiento de proteínas.

Tabla 3: Comparación de % de Identidades de secuencias de proteína actina.

<b>Traustocuítridos</b>	<b>% Identidad</b>
<i>Thraustochytriidae sp. RT49</i>	98
<i>Schizochytrium sp. ATCC 20888</i>	96
<i>Thraustochytrium striatum</i>	96
<i>Thraustochytrium aggregatum</i>	96
<i>Japonochytrium marinum</i>	95
<i>Thraustochytrium aureum</i>	95

10 La Tabla 4 muestra identidades para la secuencia de aminoácidos de beta-tubulina (SEC ID N° 5) del traustocuítrido depositado con el N° de Acceso ATCC PTA-9695 cuando se compara con secuencias de beta-tubulina disponibles en la base de datos pública. Las identidades se determinaron por el uso de la matriz de clasificación "blosum62mt2" en el programa "AlignX" del programa VectorNTI, un patrón para alineamiento de proteínas.

Tabla 4: Comparación de % Identidades de secuencias de proteína beta-tubulina.

<b>Traustocuítridos</b>	<b>% Identidad</b>
<i>Aplanochytrium kerguelense</i>	100
<i>Aplanochytrium stocchinoi</i>	100
<i>Japonochytrium marinum</i>	100
<i>Labyrinthula sp. N8</i>	100
<i>Thraustochytriidae sp. RT49</i>	100
<i>Thraustochytrium aggregatum</i>	100
<i>Thraustochytriidae sp. HU1</i>	100
<i>Thraustochytrium aureum</i>	100
<i>Thraustochytrium kinnei</i>	100
<i>Thraustochytriidae sp. #32</i>	100
<i>Thraustochytriidae sp. PW 19</i>	100
<i>Schizochytrium aggregatum</i>	100

Traustoquítridos	% Identidad
<i>Schizochytrium sp.</i> ATCC 20888	100

Basándose en las caracterizaciones anteriores, se cree que el traustoquítrido aislado depositado con el N° de Acceso ATCC PTA-9695 representa una nueva especie de *Schizochytrium* y se designa por lo tanto también como *Schizochytrium sp.* ATCC PTA-9695.

#### 5 Ejemplo 2

El traustoquítrido aislado depositado con el N° de Acceso ATCC PTA-9695 produjo altos niveles de crecimiento celular en condiciones de cultivo variables, como se describe más adelante. Los típicos medios y condiciones de cultivo se muestran en la Tabla 1. También, se observaron altos niveles de ácidos grasos y DHA (es decir, más del 50% en peso del peso de células seco eran ácidos grasos y más de 50% en peso de los ésteres metílicos de ácidos grasos era DHA).

En cultivos alimentados con carbono y nitrógeno con 8.200 ppm de Cl<sup>-</sup> a 22,5°C con 20% de oxígeno disuelto a pH 7,0, el aislado produjo un peso de células seco de 140 g/l después de 7 días de cultivo, con un contenido de ácidos grasos de 70% en peso. Se usó alimento de amoníaco de bucle cerrado y se mantuvo el pH a 7,0. La productividad de omega-3 fue 8,92 g/(l\*día) en estas condiciones, con 4,7 g/l de EPA (5% en peso de ácidos grasos) y 56,3 g/l de DHA (57% en peso de ácidos grasos) en 7 días.

En cultivos alimentados con carbono y nitrógeno con 3.640 ppm de Cl<sup>-</sup> a 22,5 °C con 20% de oxígeno disuelto a pH 7,0, el aislado produjo un peso de células seco de 82 g/l después de 7 días de cultivo, con un contenido de ácidos grasos de 58% en peso. La productividad de omega-3 fue 4,5 g/(l\*día) en estas condiciones, con 2.1 g/l de EPA (4,3% en peso de ácidos grasos) y 28,5 g/l de DHA (58,7% en peso de ácidos grasos) en 7 días.

20 En cultivos alimentados con carbono y nitrógeno con 980 ppm de Cl<sup>-</sup> a 22,5°C con 20% de oxígeno disuelto a pH 7,0, el aislado produjo un peso de células seco de 60 g/l después de 7 días de cultivo, con un contenido de ácidos grasos de 53% en peso. La productividad de omega-3 fue 2,8 g/(l\*día) en estas condiciones, con 1,1 g/l de EPA (3,4% en peso de ácidos grasos) y 18,4 g/l de DHA (56,8% en peso de ácidos grasos) en 7 días.

#### Ejemplo 3

25 Se extrajeron aceites de una muestra de biomasa (muestra A) del traustoquítrido aislado depositado con el N° de Acceso ATCC PTA-9695. La muestra de biomasa fue producida en un cultivo alimentado con carbono y nitrógeno con 980 ppm de Cl<sup>-</sup> a 22,5°C con 20% de oxígeno disuelto a pH 7,0. Los aceites se extrajeron de muestra A de biomasa por el procedimiento de extracción con hexano para proporcionar muestra A1 de aceite microbiano. En resumen, se molió la biomasa seca con hexano usando tubos de acero inoxidable y rodamientos de bolas de acero inoxidable durante aproximadamente 2 horas. Se filtró a vacío la suspensión acuosa y se recogió el líquido filtrado. Se retiró el hexano usando un evaporador rotatorio. También se extrajeron aceites de Muestra A de biomasa usando el procedimiento FRIOLEX® (GEA Westfalia Separator UK Ltd., Milton Keynes, Inglaterra) para proporcionar Muestra A2 de aceite microbiano. Se aislaron clases de lípidos individuales de las muestras A1 y A2 de aceite microbiano usando cromatografía por desorción súbita de baja presión y se determinó el porcentaje en peso de cada clase. Se determinó el perfil de ácidos grasos de cada clase usando cromatografía de gases con detección de ionización de llama (GC-FID, por sus siglas en inglés) como ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME, por sus siglas en inglés).

40 *Cromatografía por desorción súbita* – Se usó cromatografía por desorción súbita para separar las clases de lípidos presentes en los aceites brutos y determinar el porcentaje en peso de cada clase presente en los aceites. El sistema cromatográfico utilizó gel de sílice 60 (EMD Chemical, Gibbstown, NJ) con fase móvil constituida por éter de petróleo y acetato de etilo a 3 ml/min. Se usó un gradiente de etapa para eluir de manera selectiva cada clase de lípido de la columna. El gradiente de fase móvil partió de 100% de éter de petróleo y acabó con 50% de acetato de etilo (seguido por un lavado con metanol al 100%). Se recogieron las fracciones en tubos de ensayo de 10 ml usando un recolector de fracciones de lecho grande Gilson FC 204 (Gilson, Inc., Middleton, WI). Se analizó cada tubo por cromatografía de capa fina (TLC) y se mezclaron los tubos que contenían las clases de lípidos individuales (como se juzgó por manchas únicas en placa TLC con factor de retención (Rf) esperado), se concentró a sequedad y se secó. Después se determinó por gravimetría el contenido de la fracción total.

50 *Análisis TLC* – Se realizó cromatografía de capa fina sobre placas de gel de sílice. Se eluyeron las placas usando un sistema de disolventes que consistía de éter de petróleo: etil éter : ácido acético (80:20:1) y se visualizaron usando vapor de yodo. Los valores Rf de cada mancha se compararon después con valores de la bibliografía referidos para cada clase de lípidos.

*Análisis de ácidos grasos* – Se analizó en las muestras de biomasa y clases de lípidos aisladas la composición de

## ES 2 602 121 T3

- ácidos grasos como los FAME. Se pesaron las muestras directamente en tubos de ensayo con tapon de rosca y se añadió 1 ml de patrón interno C19:0 (NuCheck, Elysian, MN) en tolueno y 2 ml de HCl 1,5 N en metanol a cada tubo. Se sometieron los tubos a agitación vorticial brevemente y se pusieron en un bloque térmico durante 2 horas a 100°C. Se retiraron los tubos del bloque térmico, se dejaron enfriar y se añadió 1 ml de NaCl saturado en agua. Se sometieron de nuevo los tubos a agitación vorticial, se centrifugaron y se puso una porción de la capa de arriba (orgánica) en un vial de GC y se analizaron por GC-FID. Se cuantificaron los FAME usando una curva de calibración de patrón interno de 3 puntos generada usando patrón de referencia de GLC Nu-Chek-Prep (Nu-Chek Prep, Inc., Elysian, MN) y se identificaron provisionalmente basándose en tiempo de retención. Los ácidos grasos presentes se expresaron como mg/g y % de FAME total.
- 5
- 10 Se preparó la Muestra A1 por disolución del aceite bruto en hexano y aplicación a la cabeza de la columna. Después de fraccionamiento de la muestra usando cromatografía por desorción súbita, la fracción de éster de esteroles representó 1,2% en peso, la fracción de triacilglicerol (TAG) representó 82,7% en peso, la fracción de ácidos grasos (AFG) representó 0,9% en peso y la fracción de diacilglicerol (DAG) representó 2,9% en peso del aceite bruto. Los perfiles de ácidos grasos totales del aceite bruto de la Muestra A1 y las fracciones aisladas se muestran a continuación en la Tabla 5 y la Tabla 6 calculados como mg/g y % FAME, respectivamente.
- 15

Tabla 5: Perfiles de ácidos grasos de la Muestra A1 calculados como miligramos por gramo de FAME.

	Biomasa	Aceite bruto	Ésteres de esteroles	TAG	AFG	DAG
% en peso	NA	38%	1,2%	82,7%	0,9	2,9%
Ácido graso	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)
C12:0*	0,6	0,0	1,9	3,2	1,7	0,0
C14:0*	5,7	13,6	12,8	20,2	13,0	17,6
C14:1*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C15:0	1,3	3,4	3,1	3,1	2,1	2,6
C16:0*	105,5	239,5	222,2	274,3	183,3	225,1
C16:1*	0,0	0,0	0,8	0,0	0,8	0,0
C18:0*	6,4	16,4	43,1	16,8	9,8	14,0
C18:1 N9*	0,0	3,8	1,9	3,3	1,0	3,5
C18:1 N7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C18:2 N6*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:0*	1,8	5,5	13,0	4,7	2,0	2,9
C18:3 N3*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C18:4 N3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0
C20:2 N6*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 N6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

ES 2 602 121 T3

	Biomasa	Aceite bruto	Ésteres de esteroil	TAG	AFG	DAG
C22:0*	0,0	0,8	7,3	0,8	0,0	1,2
C20:4 N7	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0	0,0
C20:3 N3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N6*	1,0	3,4	0,0	2,6	2,0	1,9
C22:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N3	1,5	4,1	1,5	3,5	2,1	2,1
C20:5 N3*	18,2	39,5	3,5	38,4	30,6	42,8
C24:0*	0,0	0,0	6,3	0,0	0,0	0,0
C22:4 N9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C24:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C22:5 N6*	11,9	29,5	8,9	26,9	14,8	18,7
C22:5 N3*	1,1	4,7	0,9	3,6	3,4	2,7
C22:6 N3*	253,5	569,7	107,3	556,5	352,8	451,4
Suma de todos los FAME	408,6	934,0	435,4	958,0	620,1	786,4

Tabla 6: Perfiles de ácidos grasos de la Muestra A1 como un porcentaje de FAME Total.

	Biomasa	Aceite bruto	Ésteres de esteroil	TAG	AFG	DAG
Ácido graso	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME
C12:0*	0,1	0,0	0,4	0,3	0,3	0,0
C14:0*	1,4	1,5	2,9	2,1	2,1	2,2
C14:1*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C15:0	0,3	0,4	0,7	0,3	0,3	0,3
C16:0*	25,8	25,6	51,0	28,6	29,6	28,6
C16:1*	0,0	0,0	0,2	0,0	0,1	0,0
C18:0*	1,6	1,8	9,9	1,8	1,6	1,8

ES 2 602 121 T3

	Biomasa	Aceite bruto	Ésteres de esteroles	TAG	AFG	DAG
C18:1 N9*	0,0	0,4	0,4	0,3	0,2	0,4
C18:1 N7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C18:2 N6*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:0*	0,4	0,6	3,0	0,5	0,3	0,4
C18:3 N3*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C18:4 N3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0
C20:2 N6*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 N6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C22:0*	0,0	0,1	1,7	0,1	0,0	0,1
C20:4 N7	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0
C20:3 N3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4N6*	0,3	0,4	0,0	0,3	0,3	0,2
C22:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3
C20:5 N3*	4,5	4,2	0,8	4,0	4,9	5,4
C24:0*	0,0	0,0	1,4	0,0	0,0	0,0
C22:4 N9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C24:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C22:5 N6*	2,9	3,2	2,1	2,8	2,4	2,4
C22:5 N3*	0,3	0,5	0,2	0,4	0,5	0,3
C22:6 N3*	62,0	61,0	24,6	58,1	56,9	57,4
Suma de % FAME	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Se preparó la muestra A2 por disolución del aceite bruto en hexano y aplicación a la cabeza de la columna. Después de fraccionamiento de la muestra usando cromatografía por desorción súbita, la fracción de éster de esteroles representó 0,8% en peso, la fracción de triacilglicerol (TAG) representó 83,4% en peso, la fracción de ácidos grasos libre (AFG) representó 1,8% en peso y la fracción de diacilglicerol (DAG) representó 5,6% en peso del aceite bruto.

## ES 2 602 121 T3

Los perfiles de ácidos grasos totales del aceite bruto de la Muestra A2 y las fracciones aisladas se muestran a continuación en la Tabla 7 y Tabla 8 calculados como mg/g y % FAME, respectivamente.

Tabla 7: Perfiles de ácidos grasos de la Muestra A2 calculados como miligramos por gramo de FAME.

	Biomasa	Aceite bruto	Ésteres de esteroil	TAG	AFG	DAG
% en peso	NA	NA	0,8%	83,4%	1,8%	5,6%
Ácido graso	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)
C12:0*	0,6	0,0	0,0	1,5	0,0	1,0
C14:0*	5,7	13,2	8,9	14,1	9,5	5,4
C14:1*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C15:0	1,3	3,3	2,8	3,4	2,1	2,2
C16:0*	105,5	233,7	183,8	246,1	159,7	137,3
C16:1*	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0
C18:0*	6,4	16,6	23,6	16,9	11,3	5,6
C18:1 N9*	0,0	7,6	5,0	4,3	2,4	2,6
C18:1 N7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C18:2 N6*	0,0	2,2	0,7	1,6	0,8	5,1
C20:0*	1,8	5,2	12,1	5,5	2,6	1,1
C18:3 N3*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C18:4 N3	0,0	0,0	0,0	0,8	1,0	0,0
C20:2 N6*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 N6	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0
C22:0*	0,0	0,7	6,0	1,3	0,8	0,0
C20:4 N7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 N3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N6*	1,0	3,0	0,0	3,1	2,3	1,2
C22:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0



ES 2 602 121 T3

	Biomasa	Aceite bruto	Ésteres de esteroles	TAG	AFG	DAG
C20:4 N5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N3	1,5	4,1	1,4	4,3	2,7	1,0
C20:5 N3*	18,2	38,6	2,7	38,6	39,5	45,5
C24:0*	0,0	0,0	4,7	0,6	0,0	0,3
C22:4 N9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C24:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C22:5 N6*	11,9	28,2	8,6	29,6	18,0	14,7
C22:5 N3*	1,1	3,4	0,0	3,5	2,5	2,2
C22:6 N3*	253,5	566,7	102,2	575,0	475,3	447,2
Suma de todos los FAME	408,6	926,5	362,3	951,3	730,4	672,5

Tabla 8: Perfiles de ácidos grasos de la Muestra A2 como un porcentaje de FAME total.

	Biomasa	Aceite bruto	Ésteres de esteroles	TAG	AFG	DAG
Ácido graso	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME
C12:0*	0,1	0,0	0,0	0,2	0,0	0,2
C14:0*	1,4	1,4	2,4	1,5	1,3	0,8
C14:1*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C15:0	0,3	0,4	0,8	0,4	0,3	0,3
C16:0*	25,8	25,2	50,7	25,9	21,9	20,4
C16:1*	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0
C18:0*	1,6	1,8	6,5	1,8	1,5	0,8
C18:1 N9*	0,0	0,8	1,4	0,5	0,3	0,4
C18:1 N7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C18:2 N6*	0,0	0,2	0,2	0,2	0,1	0,8
C20:0*	0,4	0,6	3,3	0,6	0,4	0,2
C18:3 N3*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

ES 2 602 121 T3

	Biomasa	Aceite bruto	Ésteres de estero	TAG	AFG	DAG
C20:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C18:4 N3	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0
C20:2 N6*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 N6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C22:0*	0,0	0,1	1,7	0,1	0,1	0,0
C20:4 N7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 N3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N6*	0,3	0,3	0,0	0,3	0,3	0,2
C22:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,2
C20:5 N3*	4,5	4,2	0,7	4,1	5,4	6,8
C24:0*	0,0	0,0	1,3	0,1	0,0	0,0
C22:4 N9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C24:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C22:5 N6*	2,9	3,0	2,4	3,1	2,5	2,2
C22:5 N3*	0,3	0,4	0,0	0,4	0,3	0,3
C22:6 N3*	62,0	61,2	28,2	60,4	65,1	66,5
Suma de % FAME	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Ejemplo 4

5 Se aislaron los triacilglicéridos (los TAG) de una muestra de aceite microbiano extraída previamente del traustocítrido aislado depositado con el N° de Acceso ATCC PTA-9695 usando extracción de hexano (muestra A1) o el procedimiento FRIOLEX® (GEA Westfalia Separator UK Ltd., Milton Keynes, Inglaterra) (muestra A2), como se describe en el Ejemplo 3. El porcentaje de área relativa de cada isómero TAG se determinó usando por cromatografía líquida de alta realización de fase inversa no acuosa (NARP-HPLC, por sus siglas en inglés) con detección por ionización química a presión atmosférica-espectrometría de masa (APCI-MS, por sus siglas en inglés) y se realizó identificación provisional de cada isómero de posición usando patrones de fragmentación de los espectros de masas.

10 Se aislaron clases de lípidos individuales, incluyendo los TAG, usando cromatografía por desorción súbita. Se analizó la fracción de TAG por HPLC/APCI-MS para determinar qué restos de ácidos grasos están presentes en cada especie de TAG y las cantidades relativas de cada especie de TAG. La identificación provisional de cada pico de TAG se basaba en el tiempo de retención y el espectro APCI de cada pico. Cuando se usa NARP-HPLC, la retención de cada TAG aumenta con el número de carbonos equivalente (NCE), que se define como el número total

de carbonos en todas las cadenas acilo menos dos veces el número de dobles enlaces. También, cuando se usan condiciones cromatográficas óptimas, se pueden resolver también los pares críticos de especies de TAG con el mismo NCE pero con diferentes distribuciones de ácidos grasos saturados e insaturados, así como ácidos grasos con longitudes de cadena variables. Los espectros de masas APCI de cada pico de TAG proporciona las masas del ión molecular protonado  $[M + H]^+$ , iones aducto de amonio  $[M + NH_4]^+$  e iones de fragmentos DAG. Cada TAG proporciona un espectro de masas distintivo y la masa de los iones del fragmento de DAG ayuda a determinar la identidad de cada especie de TAG. El ión del fragmento que corresponde a una pérdida de un grupo acilo de la posición *sn*-2 será la señal menos intensa en un espectro APCI debido a que es energéticamente menos favorable que una pérdida en la posición *sn*-1 o *sn*-3. Modern Methods for Lipid Analysis by Liquid Chromatography Mass Spectrometry and Related Techniques 276-297 (William Craig Byrdwell ed., 2.005).

**Cromatografía por desorción súbita** – Se usó cromatografía por desorción súbita para separar las clases de lípidos presentes en el aceite bruto y para determinar el porcentaje en peso de cada clase presente en el aceite. El sistema cromatográfico utilizó gel de sílice 60 con una fase móvil constituida por éter de petróleo y acetato de etilo a 3 ml/min. Se usó un gradiente de etapas para eluir de manera selectiva cada clase de lípidos de la columna. El gradiente de la fase móvil partió de 100% éter de petróleo y acabó con 50% de acetato de etilo (seguido por un lavado con metanol al 100%). Se recogieron las fracciones en tubos de ensayo de 20 ml usando un recolector de fracciones de lecho grande Gilson FC 204 (Gilson, Inc., Middleton, WI). Se analizó cada tubo por TLC y se mezclaron los tubos que contenían las clases de lípidos individuales (como se juzgó por manchas únicas en placa TLC con Rf esperado), se concentró a sequedad y se secó. Después se determinó por gravimetría el contenido de la fracción total.

**Análisis TLC** - Se realizó cromatografía de capa fina en placas de gel de sílice. Se eluyeron las placas usando un sistema disolvente que consistía en éter de petróleo : etil éter : ácido acético (80:20:1) y se visualizaron usando vapor de yodo. Los valores Rf de cada mancha se compararon después con los valores de la bibliografía indicados para cada clase de lípidos.

**Análisis HPLC/APCI-MS** – El sistema LC/MS usado consistió en un modelo 1100 HPLC de Hewlett Packard provisto de ionización química a presión atmosférica (APCI) y un detector selectivo de masas (DSM) modelo 1100 de Hewlett Packard (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA). El método HPLC utilizó dos columnas C18 FENOMENEX® (250 mm x 4,6 mm, 5 µm; Fenomenex, Inc. (Torrance, CA)) conectados en serie, un caudal de 1 ml/min., un volumen de inyección de 2 µl y una temperatura de la columna de 50°C. La fase móvil consistía en acetato de amonio al 0,1% en isopropanol (Disolvente A) y acetonitrilo (Disolvente B). Se usó un gradiente lineal partiendo de Disolvente A al 20%, aumentando a 75% de Disolvente A en 40 minutos, manteniéndose a 75% de Disolvente A durante 5 minutos, volviendo a 20% de Disolvente A en 1 minuto y manteniéndose a 20% de Disolvente A durante unos 9 minutos adicionales. El intervalo de masas de DSM se fijó a *m/z* 400 – 1.150, con un voltaje del fragmentador de 150, un caudal de gas de secado de 6 l/min, una presión del nebulizador de 310 kPa (45 psig), una temperatura del gas de secado de 350°C, una temperatura del vaporizador de 325°C, un voltaje del capilar de 3.500 V y una corriente de corona de 10 µA.

**Tridocosahexaenoína (Tri-DHA)** – Se usó Tri-DHA STD (NuCheck, Elysian, MN) para evaluar el sistema cromatográfico y la precisión de la respuesta del detector. El tiempo de retención del pico Tri-DHA fue 22,5 minutos y el cromatograma de iones total (TIC, por sus siglas en inglés) proporcionó buena relación señal a ruido. El espectro de masas APCI del pico Tri-DHA muestra el ión molecular protonado  $[M + H]^+$  a *m/z* 1.023,7, los iones aducto de amonio  $[M + NH_4]^+$  a *m/z* 1.040,8 y un ión del fragmento DAG característico único a *m/z* 695,5.

Se preparó una muestra de la fracción TAG aislada en hexano y se analizó por NARP HPLC/APCI-MS para determinar las identidades de los isómeros TAG individuales.

Se evaluó el espectro de masas de cada pico y se realizó una identificación provisional de cada resto de ácido graso, como se resume en las Tablas 9 y 10 a continuación.

Tabla 9: Identificación provisional de especies TAG por LC/APCI-MS en Muestra A1.

Tiempo de retención	Pico	Identificación provisional ( <i>sn</i> -1/ <i>sn</i> -2/ <i>sn</i> -3)	Porcentaje del área	$[M+H]^+$	$[M + NH_4]^+$	Fragmentos (DAG) principales
21,4	1	EPA/EPA/DHA	0,3	971,7	988,8	643,5; 669,3
21,9	2	DHA/DHA/EPA	4,4	997,8	1.014,7	669,5; 695,5
22,4	3	DHA/DHA/DHA	11,6	1.023,7	1.040,7	695,5
23,3	4	DHA/ARA/DHA	0,5	999,6	1.016,7	671,4

ES 2 602 121 T3

Tiempo de retención	Pico	Identificación provisional (sn-1/sn-2/sn-3)	Porcentaje del área	[M+H] <sup>+</sup>	[M + NH4] <sup>+</sup>	Fragmentos (DAG) principales
23,6	5	DHA/DPA/DHA	0,2	1.025,9	1.042,8	697,5
24,1	6	DHA/DHA/ARA	0,7	999,7	1.016,8	671,5; 695,5
24,6	7	DHA/DHA/DPA	2,4	1.025,7	1.042,5	695,5; 697,4
25,3	8	EPA/14:0/DHA	0,3	897,6	914,6	569,4; 595,3
25,9	9	DHA/DHA/14:0	2,6	923,7	940,7	595,4; 695,5
27,2	10	DHA/DHA/15:0	0,4	937,8	954,7	609,5; 695,5
27,5	11	EPA/EPA/16:0	0,2	899,5	916,7	597,5; 643,5
28,0	12	DHA/16:0/EPA	4,7	925,8	942,7	597,4; 623,5; 669,3
28,5	13	DHA/DHA/16:0	30,8	951,7	968,7	623,7; 695,5
29,5	14	DHA/ARA/16:0	0,7	927,6	944,7	599,5; 671,5
29,7	15	DHA/DPA/16:0	0,9	953,7	970,8	625,5; 697,5
30,4	16	DHA/16:0/ARA	0,9	927,7	944,6	599,5; 623,5
30,8	17	DHA/16:0/DPA	4,5	953,8	970,7	623,4; 625,3
31,1	18	DHA/18:0/DHA	1,8	979,7	996,7	651,5
32,3	19	DHA/14:0/16:0	2,3	851,7	868,7	523,5
33,6	20	DHA/15:0/16:0	0,8	865,7	882,7	537,4
		DHA/20:0/DHA		1.007,8	1.024,9	679,5
34,9	21	DHA/16:0/16:0	19,3	879,7	896,7	551,5; 623,5
		DHA/22:0/DHA		1.035,8	1.052,8	707,7
36,1*	22	DHA/18:0/15:0	0,5	893,8	910,8	565,5
		DPA/16:0/16:0		881,8	898,8	551,5; 625,4
37,4	23	DHA/16:0/18:0	3,7	907,7	924,7	579,5; 623,5
38,9	24	16:0/16:0/14:0	0,3	NA	796,7	523,4; 551,5
40,1	25	TAG que contiene DHA	0,4	1.117,9	1.134,9	789,7
40,8	26	TAG que contiene DHA	0,4	1.091,9	1.108,9	763,7
41,3	27	16:0/16:0/16:0	1,0	NA	824,6	551,5

ES 2 602 121 T3

Tiempo de retención	Pico	Identificación provisional (sn-1/sn-2/sn-3)	Porcentaje del área	[M+H] <sup>+</sup>	[M + NH4] <sup>+</sup>	Fragmentos (DAG) principales
42,0	28	DHA/16:0/22:0	0,2	963,8	980,8	623,3; 635,4
43,5*	29	DHA/20:0/22:1	0,3	1.017,8	1.034,8	689,7
		16:0/20:0/14:0		835,6	852,8	579,5; 607,5
45,6*	30	DHA/22:0/22:1	0,7	1.045,8	1.062,8	717,7
46,3*	31	DHA/20:0/22:0	0,5	1.019,8	1.036,9	691,7

Tabla 10: Identificación provisional de especies TAG por LC/APCI-MS en Muestra A2

Tiempo de retención	Pico	Identificación provisional (sn-1/sn-2/sn-3)	Porcentaje del área	[M+H] <sup>+</sup>	[M + NH4] <sup>+</sup>	Fragmentos (DAG)
21,4	1	EPA/EPA/DHA	0,3	971,7	988,8	643,5; 669,3
21,9	2	DHA/DHA/EPA	4,5	997,8	1.014,7	669,5; 695,5
22,3	3	DHA/DHA/DHA	14,0	1.023,7	1.040,7	695,5
23,3	4	DHA/ARA/DHA	0,6	999,6	1.016,7	671,4
23,6	5	DHA/DPA/DHA	0,3	1.025,9	1.042,8	697,5
24,1	6	DHA/DHA/ARA	0,9	999,7	1.016,8	671,5; 695,5
24,6	7	DHA/DHA/DPA	3,0	1.025,7	1.042,5	695,5; 697,4
25,4	8	EPA/14:0/DHA	0,2	897,6	914,6	569,4; 595,3
25,9	9	DHA/DHA/14:0	2,1	923,7	940,7	595,4; 695,5
27,2	10	DHA/DHA/15:0	0,5	937,8	954,7	609,5; 695,5
27,6	11	EPA/EPA/16:0	0,2	899,5	916,7	597,5; 643,5
28,1	12	DHA/16:0/EPA	4,2	925,8	942,7	597,4; 623,5; 669,3
28,5	13	DHA/DHA/16:0	31,4	951,7	968,7	623,7; 695,5
29,6	14	DHA/ARA/16:0	0,7	927,6	944,7	599,5; 671,5
29,8	15	DHA/DPA/16:0	0,6	953,7	970,8	625,5; 697,5
30,4	16	DHA/16:0/ARA	0,9	927,7	944,6	599,5; 623,5
30,8	17	DHA/16:0/DPA	4,5	953,8	970,7	623,4; 625,3

Tiempo de retención	Pico	Identificación provisional (sn-1/sn-2/sn-3)	Porcentaje del área	[M+H] <sup>+</sup>	[M + NH4] <sup>+</sup>	Fragmentos (DAG)
31,1	18	DHA/18:0/DHA	2,2	979,7	996,7	651,5
32,4	19	DHA/14:0/16:0	1,5	851,7	868,7	523,5
33,6	20	DHA/15:0/16:0	0,9	865,7	882,7	537,4
		DHA/20:0/DHA		1.007,8	1.024,9	679,5
34,9	21	DHA/16:0/16:0	16,1	879,7	896,7	551,5; 623,5
		DHA/22:0/DHA		1.035,8	1.052,8	707,7
36,1*	22	DNA/18:0/15:0	0,4	893,8	910,8	565,5
		DPA/16:0/16:0		881,8	898,8	551,5; 625,4
37,3	23	DHA/16:0/18:0	3,4	907,7	924,7	579,5; 623,5
39,7	24	16:0/16:0/14:0	0,9	NA	796,7	523,4; 551,5
40,0	25	TAG que contiene DHA	0,8	1.117,9	1.134,9	789,7
40,8	26	TAG que contiene DHA	0,6	1.091,9	1.108,9	763,7
41,3	27	16:0/16:0/16:0	0,7	NA	824,6	551,5
42,1	28	DHA/16:0/22:0	0,3	963,8	980,8	623,3; 635,4
43,5*	29	DHA/20:0/22:1	0,2	1.017,8	1.034,8	689,7
		16:0/20:0/14:0		835,6	852,8	579,5; 607,5
45,6*	30	DHA/22:0/22:1	0,8	1.045,8	1.062,8	717,7
46,3*	31	DHA/20:0/22:0	0,7	1.019,8	1.036,9	691,7

## Ejemplo 5

5 Después de extraer el aceite a partir del caldo de fermentación usando el procedimiento Friolet, como se describe en el Ejemplo 3, se trató más el aceite bruto por etapas de refinado, blanqueado y desodorización para obtener un aceite final. Se diluyó el aceite final con aceite de girasol de alto contenido en oleico para obtener aceite comercial acabado con un contenido en DHA de aproximadamente 400 mg/g. Se aislaron las clases de lípidos individuales y se determinaron los perfiles de ácidos grasos de cada clase usando cromatografía de gases con detección de ionización de llama (GC-FID) como ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME).

10 *Cromatografía por desorción súbita* – Se usó cromatografía por desorción súbita para separar las clases de lípidos presentes en el aceite final y determinar el porcentaje en peso de cada clase presente en el aceite. El sistema cromatográfico utilizó gel de sílice 60 (EMD Chemical, Gibbstown, NJ) con fase móvil constituida por éter de petróleo y acetato de etilo a 3 ml/min. Se usó un gradiente de etapas para eluir de manera selectiva cada clase de lípidos de la columna. El gradiente de fase móvil partió de 100% éter de petróleo y acabó con 50% de acetato de etilo (seguido por un lavado con metanol al 100%). Se recogieron las fracciones en tubos de ensayo de 10 ml usando un recolector de fracciones de lecho grande Gilson FC 204 (Gilson, Inc., Middleton, WI). Se analizó cada tubo por cromatografía de capa fina (TLC) y se mezclaron los tubos que contenían clases de lípidos individuales (como se juzgó por

15 manchas únicas en placa TLC con factor de retención (Rf) esperado), se concentró a sequedad y se secó. Después

se determinó por gravimetría el contenido de la fracción total.

*Análisis TLC* - Se realizó cromatografía de capa fina en placas de gel de sílice. Se eluyeron las placas usando un sistema disolvente que consistía en éter de petróleo: etil éter: ácido acético (80:20:1) y se visualizaron usando vapor de yodo. Los valores Rf de cada mancha se compararon después con los valores de la bibliografía indicados para cada clase de lípidos.

*Análisis de ácidos grasos* – Se analizó en la muestra de aceite final y las clases de lípidos aisladas la composición de ácidos grasos como los FAME. Se pesaron las muestras directamente en tubos de ensayo con tapón de rosca y se añadió 1 ml de patrón interno C19:0 (NuCheck, Elysian, MN) en tolueno y 2 ml de HCl 1,5 N en metanol a cada tubo. Se sometieron los tubos a agitación vorticial brevemente y se pusieron en un bloque térmico durante 2 horas a 100°C. Se retiraron los tubos del bloque térmico, se dejaron enfriar y se añadió 1 ml de NaCl saturado en agua. Se sometieron de nuevo los tubos a agitación vorticial, se centrifugó y se puso una porción de la capa de arriba (orgánica) en un vial de GC y se analizó por GC-FID. Se cuantificaron los FAME usando una curva de calibración de patrón interno de 3 puntos generada usando patrón de referencia GLC Nu-Chek-Prep (Nu-Chek Prep, Inc., Elysian, MN) y se identificaron provisionalmente basándose en tiempo de retención. Los ácidos grasos presentes se expresaron como mg/g y % de FAME total.

Se preparó la muestra por disolución de 250 mg de aceite final en 600 µl de hexano y aplicación a la cabeza de la columna. Después de fraccionamiento de la muestra usando cromatografía por desorción súbita, la fracción de éster de esteroles representó 1,2% en peso, la fracción de triacilglicérido (TAG) representó 92,1% en peso, la fracción de ácidos grasos libres (FAG) representó 2,1% en peso, la fracción de esteroides representó 1,1%, la fracción de diacilglicérido (DAG) representó 2,8% en peso del aceite final.

El análisis TLC de las fracciones mezcladas mostró que la AFG y las fracciones de esteroides se mezclaron con TAG y DAG, respectivamente. Los perfiles de ácidos grasos totales del aceite final FRIOLEX® y las fracciones aisladas se muestran a continuación en la Tabla 11 y Tabla 12 calculados como mg/g y % FAME, respectivamente.

Tabla 11: Perfil de ácidos grasos calculado como miligramos por gramo de FAME.

	Aceite Final	Ésteres de esteroles	TAG	AFG	Esteroides	DAG
% en peso	NA	1,2	92,1	2,1	1,1	2,8
Ácido graso	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)
C12:0*	0,0	0,0	1,0	0,0	1,2	0,6
C14:0*	11,5	5,1	11,3	6,0	9,6	5,7
C14:1*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C15:0	2,3	0,0	2,3	1,2	2,0	1,9
C16:0*	183,3	80,0	180,8	99,9	149,3	132,2
C16:1*	0,0	0,0	0,9	0,0	0,8	0,6
C18:0*	19,6	17,5	19,6	7,5	16,2	6,7
C18:1 N9*	243,3	242,8	249,6	62,9	190,5	84,0
C18:1 N7	1,9	1,7	2,0	0,8	1,9	0,9
C18:2 N6*	13,8	5,6	13,8	6,2	14,3	9,1
C20:0*	4,3	6,6	4,5	1,5	3,6	1,4

ES 2 602 121 T3

	Aceite Final	Ésteres de estero	TAG	AFG	Esterol	DAG
C18:3 N3*	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0
C20:1 N9*	0,0	0,0	0,8	0,0	0,8	0,0
C18:4 N3	0,0	0,0	0,7	1,3	0,9	0,4
C20:2 N6*	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0
C20:3 N6	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0
C22:0*	3,3	61,0	3,2	1,1	3,0	1,2
C20:4 N7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 N3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4N6*	1,7	0,0	2,3	1,4	1,9	1,3
C22:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N3	2,4	4,5	3,0	2,2	2,6	1,3
C20:5 N3*	28,1	3,0	27,7	38,6	25,6	43,2
C24:0*	1,4	64,3	1,4	0,0	2,0	1,0
C22:4 N9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C24:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C22:5 N6*	20,0	7,6	21,0	10,1	17,2	14,4
C22:5 N3*	2,8	0,0	3,1	3,7	3,4	2,9
C22:6 N3*	407,1	72,5	417,4	443,6	350,5	428,5
Suma de todos los FAME	936,1	572,1	967,6	688,0	797,3	737,3



ES 2 602 121 T3

Tabla 12: Perfiles de ácidos grasos como un porcentaje de FAME Total.

	Aceite Final	Ésteres de esteroil	TAG	AFG	Esterol	DAG
Ácido graso	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME
C12:0*	0,0	0,0	0,1	0,0	0,2	0,1
C14:0*	1,2	0,9	1,2	0,9	1,2	0,8
C14:1*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C15:0	0,2	0,0	0,2	0,2	0,2	0,3
C16:0*	19,6	14,0	18,7	14,5	18,7	17,9
C16:1*	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,1
C18:0*	2,1	3,1	2,0	1,1	2,0	0,9
C18:1 N9*	26,0	42,4	25,8	9,1	23,9	11,4
C18:1 N7	0,2	0,3	0,2	0,1	0,2	0,1
C18:2 N6*	1,5	1,0	1,4	0,9	1,8	1,2
C20:0*	0,5	1,1	0,5	0,2	0,5	0,2
C18:3 N3*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:1 N9*	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0
C18:4 N3	0,0	0,0	0,1	0,2	0,1	0,1
C20:2 N6*	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
C20:3 N6*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C22:0*	0,4	10,7	0,3	0,2	0,4	0,2
C20:4 N7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 N3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4N6*	0,2	0,0	0,2	0,2	0,2	0,2
C22:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N3	0,3	0,8	0,3	0,3	0,3	0,2
C20:5 N3*	3,0	0,5	2,9	5,6	3,2	5,9

	Aceite Final	Ésteres de esteroles	TAG	AFG	Esterol	DAG
C24:0*	0,2	11,2	0,1	0,0	0,2	0,1
C22:4 N9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C24:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C22:5 N6*	2,1	1,3	2,2	1,5	2,2	1,9
C22:5 N3*	0,3	0,0	0,3	0,5	0,4	0,4
C22:6 N3*	43,6	12,7	43,1	64,5	44,0	58,1
Suma de % de FAME	100	100	100	100	100	100

## Ejemplo 6

5 Se realizó un análisis de los triacilglicéridos (los TAG) del aceite final descrito en el Ejemplo 5 usando técnicas descritas en el Ejemplo 4. Se realizó la identificación provisional de cada resto de ácido graso, como se resume en las Tablas 13 y 14 a continuación.

Tabla 13: Identificación provisional de especies TAG principales.

Tiempo de retención máx., min,	Identificación provisional ( <i>sn-1/sn-2/sn-3</i> )	Porcentaje del área
22,0	DHA/DHA/EPA	3,4
22,5	DHA DHA/DHA	10,4
24,7	DHA/DHA/DPA	2,1
28,2	DHA/16:0/EPA	3,4
28,7	DHA/16:0/DHA	23,0
31,0	DHA/16:0/DPA	3,3
35,2	DHA/16:0/16:0	11,6
37,6	DHA/16:0/18:0	4,3
40,4	18:1/18:1/18:1	14,0

Tabla 14: Identificación provisional de especies TAG por LC/APCI-MS

Tiempo de retención	Pico	Identificación provisional ( <i>sn-1/sn-2/sn-3</i> )	Porcentaje del área	[M + H] <sup>+</sup>	[M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	Fragmentos (DAG)
21,5	1	EPA/EPA/DHA	0,4	971,7	988,7	643,5; 669,5
22,0	2	DHA/DHA/EPA	3,4	997,8	1.014,7	669,4; 695,5

ES 2 602 121 T3

Tiempo de retención	Pico	Identificación provisional (sn-1/sn-2/sn-3)	Porcentaje del área	[M + H] <sup>+</sup>	[M + NH4] <sup>+</sup>	Fragmentos (DAG)
22,5	3	DHA/DHA/DHA	10,4	1.023,8	1.040,7	695,5
23,4	4	DHA/DHA/ARA	0,5	999,8	1.016,7	671,4; 695,3
23,7	5	DHA/DPA/DHA	0,3	1.025,7	1.042,7	697,5
24,2	6	DHA/DHA/ARA	0,8	999,7	1.016,8	671,5; 695,5
24,7	7	DHA/DHA/DPA	2,1	1.025,7	1.042,5	695,5; 697,4
25,6	8	EPA/14:0/DHA	0,2	897,7	914,8	569,4; 595,3
26,1	9	DHA/14:0/DHA	1,4	923,7	940,7	595,5; 695,5
27,4	10	DHA/15:0/DHA	0,3	937,8	954,8	609,3
27,7	11	EPA/16:0/EPA	0,2	899,5	916,7	597,5
28,2	12	DHA/16:0/EPA	3,4	925,7	942,7	597,5; 623,4; 669,3
28,7	13	DHA/16:0/DHA	23,0	951,7	968,7	623,5; 695,5
29,8	14	DHA/16:0/ARA	0,5	927,7	944,8	599,5; 623,5
30,0	15	DHA/16:0/DPA	0,7	953,8	970,8	623,4; 625,5
30,6	16	DHA/16:0/ARA	0,8	927,7	944,8	599,5; 623,5
31,0	17	DHA/16:0/DPA	3,3	953,7	970,7	623,4; 625,5
31,3	18	DHA/18:0/DHA	1,6	979,8	996,8	651,5
32,6	19	DHA/14:0/16:0	1,6	851,8	868,8	523,5
33,9	20	DHA/15:0/16:0	0,8	865,7	882,7	537,4
		DHA/20:0/DHA		1.007,8	1.024,8	679,5
35,2	21	DHA/16:0/16:0	11,6	879,7	896,8	551,5; 623,5
		DHA/22:0/DHA		1.035,8	1.052,8	707,7
36,4	22	DHA/18:0/15:0	0,5	893,8	910,8	565,5
		DPA/16:0/16:0		881,8	898,8	551,5; 625,4
37,6	23	DHA/16:0/18:0	4,3	907,8	924,8	579,5; 623,5
40,0	24	DHA/16:0/20:0	0,8	935,8	952,8	607,6; 623,5

Tiempo de retención	Pico	Identificación provisional (sn-1/sn-2/sn-3)	Porcentaje del área	[M + H] <sup>+</sup>	[M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	Fragmentos (DAG)
40,4	25	18:1/18:1/18:1	14,0	885,8	902,8	603,5
40,7	26	18:1/16:0/18:1	2,2	859,8	876,8	577,5
41,1	27	TAG que contiene DHA	1,6	1.092,0	1.108,8	763,7
42,4	28	TAG que contiene 24:0	0,5	963,8	980,9	594,5
43,0	29	18:1/18:1/18:0	1,9	887,7	904,8	603,6; 605,6
45,9	30	DHA/22:0/22:1	0,9	1.045,9	1.062,9	717,6
46,6	31	DHA/20:0/22:0	0,7	1.019,8	1.036,8	691,5

## Ejemplo 7

Se preparó un matraz de inóculo de dos días del traustoquítrido aislado depositado con el N° de Acceso ATCC PTA-9695 en un cultivo alimentado con carbono y nitrógeno con 980 ppm de Cl<sup>-</sup> (medio de traustoquítrido).

5 Se realizó mutagénesis según el siguiente procedimiento:

10 Se vertió un matraz de T=2 días, estéril, aproximadamente 50 ml, en un homogeneizador de vidrio de 40 ml, estéril. El cultivo recibió 50 inmersiones en el homogeneizador. Se pipeteó el cultivo y se filtró a través de un filtro de malla de 50 micrómetros, estéril, que se puso en un tubo estéril de 50 ml (la malla se usó como un medio para retener los grumos más grandes de colonias al tiempo que se dejaban las agrupaciones más pequeñas y pasaban las células solas por la malla de 50 micrómetros). Se recogió el macerado concentrado completo en un tubo estéril de 50 ml. Se sometió a agitación vorticial el cultivo macerado y se realizaron diluciones a niveles hasta 1:100 veces en tubos que contenían medio de traustoquítrido. Se agitaron de manera vorticial las muestras maceradas, diluidas, previamente a la adición de 200 µl de inóculo a una placa petri de agar con medio de traustoquítrido, 100 x 15 mm, que contenía 4-5 perlas de vidrio (perlas de vidrio de 3 mm). Se agitó suavemente cada placa en un esfuerzo por hacer que las perlas extendieran el inóculo uniformemente por la placa. Se retiraron las perlas de las placas y se dejaron reposar las placas tapadas durante aproximadamente 5 minutos para secarse. Las luces tanto en la cubierta estéril como en áreas adyacentes se apagaron a medida que se realizaba el procedimiento con luz tenue. Hubo una luz mínima disponible para poder realizar el procedimiento pero sólo indirecta y tenue.

20 Se pusieron placas de cinco replicados en el suelo del reticulador XL (Spectronics Corporation, Nueva York) con las tapas fuera mientras se irradiaban las muestras. El reticulador suministró polvo en términos de microjulios y se buscó un nivel que conseguía una destrucción del 90%-95%. Se inocularon placas de control de cinco replicados con células no mutagenizadas usando el mismo protocolo. Estos recuentos de células se usaron para calcular el % de destrucción. Una vez que acabó la irradiación se sacaron las placas, se reemplazaron las tapas, se envolvieron las placas con parafilm mediante una envoltura de hoja fina de aluminio. Fue indispensable que las placas se cultivaran durante la primera semana en la oscuridad de manera que no se pudieran reparar los genes dañados.

25 Se pusieron las placas en una habitación a 22,5°C durante aproximadamente 10 días previamente al recuento de las colonias. Cuando se realizaron los recuentos finales, se recogieron las colonias individuales con un bucle de inoculación estéril y se volvieron a sembrar en estrías en nuevas placas de medio de traustoquítrido. Se puso cada colonia en una placa individual. Como las placas se tornaban densas se tomó una muestra, usando un asa de siembra y se inoculó en un matraz oscilante estéril de 250 ml que contenía 50 ml de medio de traustoquítrido. Este matraz se puso en un agitador a 21 rad/s (200 rpm) en una habitación a 22,5°C. A los T=7 días se recogió el cultivo del matraz oscilante a un tubo estéril de 50 ml. Se tomó el pH y se centrifugó la muestra para recoger el botón de biomasa. Cada muestra se enjuagó y se volvió a suspender en una mezcla 50:50 de alcohol isopropílico y agua destilada previamente a volver a centrifugar. Se liofilizó el botón recogido, se pesó y se realizó un análisis de FAME. Los datos en las Tablas 15-21 representan mutantes producidos con el procedimiento anterior.

ES 2 602 121 T3

Tabla 15: Mutantes de cepa de traustoquítrido N° Acceso ATCC PTA-9695.

Ácidos grasos	ATCC PTA-9695 control	Mutante 1	Mutante 2	Mutante 3	Mutante 4	Mutante 5	Mutante 8	Mutante 9	Mutante 10
% 08:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 09:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 10:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 11:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 11:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 12:0	0,10	0,10	0,08	0,08	0,13	0,07	0,11	0,08	0,08
% 12:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 13:0	0,11	0,11	0,17	0,13	0,12	0,18	0,11	0,15	0,14
% 13:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 14:0	1,79	1,85	1,49	1,37	2,36	1,29	1,85	1,72	1,57
% 14:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 15:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 16:0	30,98	28,75	29,96	29,97	30,33	29,86	30,97	30,11	29,20
% 16:1	0,27	0,20	0,31	0,14	0,25	0,27	0,16	0,27	0,24
% 16:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 16:3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 17:0	0,12	0,15	0,13	0,17	0,27	0,12	0,16	0,13	0,13
% 18:0	1,29	1,22	1,38	1,47	1,22	1,57	1,25	1,34	1,34
% 18:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:1 n-7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:3 n-6	0,00	0,03	0,00	0,00	0,07	0,00	0,03	0,00	0,00
% 18:3 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:4 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:0	0,39	0,36	0,42	0,45	0,34	0,46	0,37	0,40	0,40

ES 2 602 121 T3

Ácidos grasos	ATCC PTA-9695 control	Mutante 1	Mutante 2	Mutante 3	Mutante 4	Mutante 5	Mutante 8	Mutante 9	Mutante 10
% 20:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:3 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:3 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:3 n-3	0,37	0,38	0,32	0,42	0,44	0,32	0,41	0,33	0,36
% 20:4 ARA	0,55	0,55	0,94	0,57	0,80	0,89	0,60	0,73	0,75
% 20:5 n-3 EPA	2,62	2,94	3,01	2,40	3,64	2,83	2,54	2,81	2,81
% 22:0	0,08	0,08	0,09	0,09	0,07	0,10	0,07	0,09	0,09
% 22:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:4 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:5 n-6	3,19	3,19	2,94	3,43	3,35	2,87	3,34	3,01	3,15
% 22:5 n-3	0,18	0,18	0,21	0,23	0,20	0,18	0,20	0,17	0,18
% 22:6 n-3 DHA	56,88	58,63	57,56	57,85	54,87	57,98	56,62	57,53	58,52
% 24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 24:1	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,09	0,00
% Grasa	46,83	46,10	31,23	47,39	49,78	30,62	54,71	37,72	37,87
% Desconocido	0,85	0,46	0,35	0,51	0,51	0,36	0,50	0,38	0,39

Tabla 16: Mutantes de cepa de traustokuítrido N° Acceso ATCC PTA-9695.

Ácidos grasos	ATCC PTA-9695 control	Mutante 11	Mutante 13	Mutante 14	Mutante 15	Mutante 16	Mutante 20	Mutante 21	Mutante 22
% 08:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 09:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

ES 2 602 121 T3

Ácidos grasos	ATCC PTA-9695 control	Mutante 11	Mutante 13	Mutante 14	Mutante 15	Mutante 16	Mutante 20	Mutante 21	Mutante 22
% 10:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 11:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 11:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 12:0	0,10	0,10	0,08	0,09	0,11	0,11	0,09	0,09	0,10
% 12:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 13:0	0,11	0,15	0,16	0,14	0,13	0,12	0,17	0,16	0,13
% 13:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 14:0	1,79	1,89	1,43	1,75	1,83	1,98	1,76	1,77	1,81
% 14:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 15:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 16:0	30,98	31,08	30,27	29,92	31,79	30,18	28,84	30,05	30,81
% 16:1	0,27	0,32	0,26	0,28	0,21	0,24	0,23	0,23	0,33
% 16:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 16:3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 17:0	0,12	0,24	0,15	0,13	0,15	0,12	0,14	0,16	0,14
% 18:0	1,29	1,36	1,44	1,31	1,36	1,21	1,28	1,34	1,33
% 18:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:1 n-7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:3 n-6	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00
% 18:3 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:4 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:0	0,39	0,38	0,42	0,39	0,40	0,37	0,37	0,38	0,38
% 20:1 n-9	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:3 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

ES 2 602 121 T3

Ácidos grasos	ATCC PTA-9695 control	Mutante 11	Mutante 13	Mutante 14	Mutante 15	Mutante 16	Mutante 20	Mutante 21	Mutante 22
% 20:3 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:3 n-3	0,37	0,43	0,36	0,33	0,36	0,37	0,33	0,35	0,34
% 20:4 ARA	0,55	0,79	0,72	0,80	0,64	0,62	0,83	0,73	0,69
% 20:5 n-3 EPA	2,62	3,17	2,72	2,97	2,52	2,66	3,03	2,90	2,87
% 22:0	0,08	0,08	0,09	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
% 22:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:4 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:5 n-6	3,19	3,25	3,06	2,97	3,07	3,16	2,98	3,01	3,02
% 22:5 n-3	0,18	0,20	0,19	0,17	0,19	0,16	0,17	0,18	0,18
% 22:6 n-3 DHA	56,88	55,17	57,52	57,63	56,02	57,38	58,58	57,45	56,65
% 24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 24:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,00	0,00	0,08
% Grasa	46,83	46,19	37,00	38,41	48,46	47,32	37,71	40,23	43,55
% Desconocido	0,85	0,47	0,39	0,36	0,47	0,44	0,37	0,39	0,38

Tabla 17: Mutantes de cepa de traustoquítrido N° Acceso ATCC PTA-9695.

Ácidos grasos	ATCC PTA-9695 control	Mutante 24	Mutante 26	Mutante 27	Mutante 29	Mutante 30	Mutante 33	Mutante 34	Mutante 35
% 08:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 09:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 10:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 11:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 11:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00



ES 2 602 121 T3

Ácidos grasos	ATCC PTA-9695 control	Mutante 24	Mutante 26	Mutante 27	Mutante 29	Mutante 30	Mutante 33	Mutante 34	Mutante 35
% 12:0	0,10	0,11	0,09	0,09	0,08	0,08	0,10	0,11	0,09
% 12:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 13:0	0,11	0,12	0,13	0,14	0,16	0,14	0,12	0,12	0,10
% 13:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 14:0	1,79	1,98	1,71	1,69	1,63	1,66	1,93	2,01	1,59
% 14:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 15:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,70	0,54	0,39
% 16:0	30,98	30,61	30,32	30,21	29,70	29,50	30,26	32,28	30,78
% 16:1	0,27	0,19	0,22	0,22	0,26	0,26	0,29	0,26	0,16
% 16:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 16:3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 17:0	0,12	0,15	0,18	0,16	0,13	0,13	0,26	0,16	0,12
% 18:0	1,29	1,24	1,31	1,31	1,32	1,30	1,32	1,37	1,34
% 18:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,11	0,09
% 18:1 n-7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:3 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:3 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:4 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:0	0,39	0,37	0,39	0,40	0,40	0,39	0,37	0,40	0,40
% 20:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,14
% 20:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:3 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:3 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:3 n-3	0,37	0,38	0,37	0,35	0,35	0,35	0,00	0,00	0,00
% 20:4 ARA	0,55	0,61	0,59	0,69	0,68	0,32	0,34	0,24	0,28

ES 2 602 121 T3

Ácidos grasos	ATCC PTA-9695 control	Mutante 24	Mutante 26	Mutante 27	Mutante 29	Mutante 30	Mutante 33	Mutante 34	Mutante 35
% 20:5 n-3 EPA	2,62	2,62	2,70	2,85	2,90	2,91	3,28	2,51	2,59
% 22:0	0,08	0,08	0,08	0,08	0,09	0,08	0,08	0,08	0,08
% 22:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:4 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:5 n-6	3,19	3,10	3,11	3,05	3,10	3,11	3,43	3,26	3,56
% 22:5 n-3	0,18	0,16	0,18	0,19	0,18	0,18	0,18	0,15	0,24
% 22:6 n-3 DHA	56,88	57,03	57,46	57,46	57,96	58,52	55,92	54,96	56,73
% 24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 24:1	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,07	0,07
% Grasa	46,83	47,80	43,50	38,86	38,60	38,16	46,95	46,43	51,55
% Desconocido	0,85	0,45	0,42	0,39	0,37	0,82	1,25	1,23	1,25

ES 2 602 121 T3

Tabla 18: Mutantes de cepa de traustoquítrido N° Acceso ATCC PTA-9695.

Ácidos grasos	ATCC PTA-9695 control	Mutante 36	Mutante 37	Mutante 38	Mutante 39	Mutante 40	Mutante 42	Mutante 43	Mutante 44
% 08:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 09:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 10:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 11:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 11:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 12:0	0,10	0,00	0,11	0,00	0,11	0,09	0,08	0,12	0,09
% 12:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 13:0	0,11	0,44	0,09	0,24	0,12	0,11	0,12	0,08	0,15
% 13:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 14:0	1,79	1,25	1,99	1,48	1,96	1,76	1,43	2,17	1,75
% 14:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 15:1	0,00	2,12	0,48	0,71	0,54	0,55	0,36	0,62	0,50
% 16:0	30,98	26,95	28,04	32,28	30,84	30,25	25,77	43,37	30,18
% 16:1	0,27	0,00	0,26	0,23	0,22	0,21	0,10	1,05	0,22
% 16:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 16:3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 17:0	0,12	0,95	0,13	0,28	0,16	0,16	0,10	0,26	0,13
% 18:0	1,29	1,58	1,11	1,79	1,30	1,29	1,25	2,21	1,34
% 18:1 n-9	0,00	0,37	0,08	0,25	0,09	0,09	0,12	0,09	0,10
% 18:1 n-7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00
% 18:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:3 n-6	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:3 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:4 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:0	0,39	0,34	0,31	0,43	0,38	0,39	0,36	0,61	0,40

ES 2 602 121 T3

Ácidos grasos	ATCC PTA-9695 control	Mutante 36	Mutante 37	Mutante 38	Mutante 39	Mutante 40	Mutante 42	Mutante 43	Mutante 44
% 20:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,43	0,00	0,14	0,15	0,15	0,49
% 20:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:3 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:3 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:3 n-3	0,37	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:4 ARA	0,55	0,41	0,31	0,24	0,27	0,24	0,30	0,35	0,23
% 20:5 n-3 EPA	2,62	5,36	2,77	4,00	2,72	2,80	3,21	3,47	2,80
% 22:0	0,08	0,00	0,07	0,14	0,07	0,08	0,07	0,14	0,08
% 22:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:4 n-6	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:5 n-6	3,19	2,40	3,94	2,57	3,48	3,29	3,89	2,37	3,33
% 22:5 n-3	0,18	0,00	0,19	0,00	0,17	0,17	0,30	0,33	0,17
% 22:6 n-3 DHA	56,88	57,52	58,57	54,20	56,24	57,09	60,99	41,61	56,76
% 24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 24:1	0,00	0,00	0,08	0,00	0,08	0,09	0,08	0,06	0,09
% Grasa	46,83	12,73	54,86	18,08	45,74	42,59	42,48	56,44	41,20
% Desconocido	0,85	0,29	1,36	0,73	1,26	1,20	1,31	0,90	1,20

Tabla 19: Mutantes de cepa de traustoquítrido N° Acceso ATCC PTA-9695.

Ácidos grasos	ATCC PTA-9695 control	Mutante 45	Mutante 46	Mutante 47	Mutante 48	Mutante 49	Mutante 50	Mutante 51	Mutante 52
% 08:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 09:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

ES 2 602 121 T3

Ácidos grasos	ATCC PTA-9695 control	Mutante 45	Mutante 46	Mutante 47	Mutante 48	Mutante 49	Mutante 50	Mutante 51	Mutante 52
% 10:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 11:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 11:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 12:0	0,10	0,10	0,13	0,11	0,07	0,09	0,09	0,09	0,11
% 12:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 13:0	0,11	0,11	0,10	0,09	0,13	0,09	0,13	0,10	0,09
% 13:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 14:0	1,79	1,79	2,07	1,86	1,52	1,62	1,78	1,78	1,85
% 14:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 15:1	0,00	0,41	0,76	0,57	0,46	0,48	0,55	0,53	0,53
% 16:0	30,98	28,79	24,90	30,07	29,07	31,21	30,46	30,79	32,53
% 16:1	0,27	0,19	0,24	0,18	0,17	0,17	0,18	0,21	0,22
% 16:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 16:3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 17:0	0,12	0,11	0,24	0,16	0,12	0,14	0,17	0,18	0,15
% 18:0	1,29	1,24	1,07	1,28	1,41	1,43	1,36	1,48	1,35
% 18:1 n-9	0,00	0,08	0,07	0,09	0,09	0,08	0,10	0,09	0,06
% 18:1 n-7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:3 n-6	0,00	0,00	0,12	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:3 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:4 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:0	0,39	0,36	0,29	0,37	0,42	0,42	0,39	0,40	0,41
% 20:1 n-9	0,00	0,15	0,13	0,11	0,24	0,13	0,19	0,16	0,19
% 20:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:3 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

ES 2 602 121 T3

Ácidos grasos	ATCC PTA-9695 control	Mutante 45	Mutante 46	Mutante 47	Mutante 48	Mutante 49	Mutante 50	Mutante 51	Mutante 52
% 20:3 n-6	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:3 n-3	0,37	0,00	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:4 ARA	0,55	0,29	0,65	0,26	0,18	0,21	0,22	0,24	0,24
% 20:5 n-3 EPA	2,62	3,05	4,28	2,66	2,93	2,46	2,71	2,94	2,44
% 22:0	0,08	0,07	0,06	0,07	0,09	0,09	0,08	0,08	0,08
% 22:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:4 n-6	0,00	0,06	0,07	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:5 n-6	3,19	3,59	4,28	3,46	3,07	3,32	3,17	3,18	3,24
% 22:5 n-3	0,18	0,25	0,27	0,18	0,17	0,17	0,16	0,17	0,17
% 22:6 n-3 DHA	56,88	57,74	58,32	56,70	58,65	56,45	56,83	56,19	55,06
% 24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 24:1	0,00	0,07	0,15	0,10	0,10	0,11	0,10	0,10	0,07
% Grasa	46,83	48,91	58,95	54,80	35,41	48,60	44,93	43,01	51,93
% Desconocido	0,85	1,55	1,63	1,57	1,09	1,35	1,31	1,28	1,19

Tabla 20: Mutantes de cepa de traustoquítrido N° Acceso ATCC PTA-9695.

Ácidos grasos	ATCC PTA-9695 control	Mutante 53	Mutante 54	Mutante 55	Mutante 56	Mutante 57	Mutante 58	Mutante 60	Mutante 61	Mutante 65
% 08:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 09:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 10:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 11:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 11:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

ES 2 602 121 T3

Ácidos grasos	ATCC PTA-9695 control	Mutante 53	Mutante 54	Mutante 55	Mutante 56	Mutante 57	Mutante 58	Mutante 60	Mutante 61	Mutante 65
% 12:0	0,10	0,09	0,08	0,12	0,08	0,08	0,08	0,08	0,10	0,08
% 12:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 13:0	0,11	0,11	0,12	0,08	0,09	0,13	0,16	0,14	0,09	0,14
% 13:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 14:0	1,79	1,74	1,63	2,13	1,67	1,59	1,59	1,59	1,85	1,58
% 14:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 15:1	0,00	0,53	0,52	0,48	0,51	0,52	0,45	0,50	0,51	0,48
% 16:0	30,98	30,13	29,54	33,01	31,08	29,37	30,65	29,39	31,15	30,03
% 16:1	0,27	0,21	0,23	0,26	0,26	0,14	0,25	0,22	0,26	0,25
% 16:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 16:3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 17:0	0,12	0,15	0,14	0,14	0,14	0,16	0,12	0,13	0,14	0,13
% 18:0	1,29	1,30	1,30	1,37	1,38	1,37	1,46	1,30	1,30	1,35
% 18:1 n-9	0,00	0,08	0,08	0,00	0,06	0,11	0,09	0,10	0,07	0,07
% 18:1 n-7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:3 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:3 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:4 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:0	0,39	0,38	0,39	0,40	0,42	0,38	0,43	0,39	0,39	0,41
% 20:1 n-9	0,00	0,19	0,16	0,13	0,19	0,20	0,17	0,14	0,13	0,21
% 20:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:3 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:3 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:3 n-3	0,37	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

ES 2 602 121 T3

Ácidos grasos	ATCC PTA-9695 control	Mutante 53	Mutante 54	Mutante 55	Mutante 56	Mutante 57	Mutante 58	Mutante 60	Mutante 61	Mutante 65
% 20:4 ARA	0,55	0,25	0,21	0,26	0,22	0,25	0,51	0,20	0,24	0,19
% 20:5 n-3 EPA	2,62	2,75	2,78	2,81	2,67	2,78	5,76	2,72	2,59	2,82
% 22:0	0,08	0,08	0,08	0,08	0,09	0,08	0,09	0,08	0,08	0,09
% 22:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:4 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00
% 22:5 n-6	3,19	3,47	3,20	3,25	3,19	3,43	2,62	3,30	3,42	3,18
% 22:5 n-3	0,18	0,18	0,18	0,17	0,17	0,20	0,59	0,17	0,17	0,17
% 22:6 n-3 DHA	56,88	56,99	58,07	54,04	56,38	57,76	54,09	58,21	55,91	57,56
% 24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 24:1	0,00	0,09	0,09	0,07	0,10	0,09	0,11	0,10	0,07	0,08
% Fat	46,83	45,83	39,59	48,81	41,92	43,97	33,96	36,97	50,40	36,21
% Desconocido	0,85	1,28	1,19	1,19	1,29	1,35	0,77	1,24	1,48	1,17

Tabla 21: Mutantes de cepa de traustoquítrido N° Acceso ATCC PTA-9695.

Ácidos grasos	ATCC PTA-9695 control	Mutante 66	Mutante 67	Mutante 68 ATCC PTA-9696	Mutante 69	Mutante 70 ATCC PTA-9697	Mutante 71	Mutante 72 ATCC PTA-9698	Mutante 73	Mutante 74
% 08:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 09:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 10:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 11:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 11:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 12:0	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00



ES 2 602 121 T3

Ácidos grasos	ATCC PTA-9695 control	Mutante 66	Mutante 67	Mutante 68 ATCC PTA-9696	Mutante 69	Mutante 70 ATCC PTA-9697	Mutante 71	Mutante 72 ATCC PTA-9698	Mutante 73	Mutante 74
% 12:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 13:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 13:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,22	0,00	0,00	0,00
% 14:0	2,42	2,29	2,07	2,09	2,11	2,21	2,27	2,29	1,97	2,05
% 14:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,19	0,00	0,00	0,00
% 15:1	0,55	0,47	0,48	0,47	0,47	0,44	0,46	0,40	0,50	0,47
% 16:0	39,19	31,02	26,20	25,84	27,79	28,14	28,89	33,49	24,50	23,95
% 16:1	0,43	0,19	0,00	0,00	0,00	0,00	0,19	0,21	0,00	0,00
% 16:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 16:3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 17:0	0,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00
% 18:0	1,67	1,68	1,22	1,22	1,44	1,49	1,51	2,24	1,11	1,02
% 18:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:1 n-7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:3 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:3 n-3	0,00	0,18	0,20	0,21	0,19	0,17	0,22	0,16	0,22	0,22
% 18:4 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:0	0,49	0,41	0,32	0,31	0,35	0,37	0,44	0,52	0,29	0,27
% 20:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:3 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:3 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:3 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:4 ARA	0,18	0,16	0,33	0,27	0,24	0,37	0,30	0,27	0,38	0,39

ES 2 602 121 T3

Ácidos grasos	ATCC PTA-9695 control	Mutante 66	Mutante 67	Mutante 68 ATCC PTA-9696	Mutante 69	Mutante 70 ATCC PTA-9697	Mutante 71	Mutante 72 ATCC PTA-9698	Mutante 73	Mutante 74
% 20:5 n-3 EPA	1,76	2,30	3,86	3,97	3,32	4,12	3,09	2,74	4,43	4,53
% 22:0	0,33	0,46	0,35	0,44	0,48	0,38	0,43	0,12	0,35	0,34
% 22:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:4 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:5 n-6	2,62	2,83	3,17	2,66	2,72	2,95	3,46	2,79	3,17	3,19
% 22:5 n-3	0,18	0,18	0,46	0,42	0,34	0,61	0,25	0,27	0,48	0,57
% 22:6 n-3 DHA	49,52	57,01	60,60	61,42	59,74	58,03	55,62	53,06	61,83	62,23
% 24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% 24:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% Grasa	52,70	49,32	48,51	49,49	48,80	53,65	40,38	63,40	48,27	46,63
% Desconocido	0,35	0,82	0,73	0,66	0,67	0,73	2,46	1,18	0,78	0,76

Ejemplo 8

Se obtuvieron cuatro muestras de traustóquidos de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) y se analizó en cada muestra el perfil de ácidos grasos de la biomasa, el perfil de ácidos grasos del aceite bruto extraído, la fracción de triacilglicérido (TAG) del aceite bruto y la fracción de lípidos polares (LP) del aceite bruto. Las muestras analizadas fueron ATCC 34304, 20890, 20889 y 20892. Se inocularon las cepas en matraces oscilantes de 250 ml que contenían 50 ml del siguiente medio: 1 g de peptona, 1 g de extracto de levadura, 5 g de glucosa en 1 litro de agua de mar artificial. Se incubaron los cultivos a 20°C con agitación a 21 rad/s (200 rpm) en un agitador orbital. Después de 7 días se recogieron los cultivos por centrifugación (5.087 xg), se lavaron con una mezcla de agua: isopropanol (1:1) y se centrifugó de nuevo. Se liofilizó el botón resultante. Se extrajo el aceite bruto de la biomasa seca usando el método de Bligh y Dyer (Can. J. de Biol. And Phys. 37: 911-917 (1.959)). Se aislaron los TAG y LP del aceite bruto usando una variación del método de la fase sólida extraída (SPE, por sus siglas en inglés) desarrollado por Kaluzny et al. (*J. Lipid Res.* 26: 135-140 (1.959)). Se analizó en el aceite bruto y las fracciones aisladas el contenido en DHA y EPA así como el contenido en ácido graso total (como ésteres metílicos de ácidos grasos).

*Extracción de lípidos* – Se extrajo aceite bruto de la biomasa liofilizada pesando 100 a 200 mg en un tubo de ensayo de parte superior roscada de 1,5 x 10 cm, añadiendo 8 ml de un sistema monofásico que consistía en cloroformo : metanol : agua (CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O) 1:2:0,8 homogeneizando con una unidad de dispersión PT 3100 POLYTRON® provista de un agregado de PT-DA 3012/2. Se homogeneizó la muestra durante 2 minutos a 1.047 rad/s (10.000 rpm) mientras se sumergía en un baño de hielo. Se produjo un sistema bifásico por adición de 2,1 ml de CHCl<sub>3</sub>, agitando de manera vorticial durante 1 minuto, añadiendo 1,7 ml de H<sub>2</sub>O y sometiendo a agitación vorticial de nuevo durante 1 minuto adicional. Se retiró la capa del fondo (orgánica) usando una pipeta Pasteur y se puso en un matraz de recogida. Se volvió a extraer la capa de MeOH-H<sub>2</sub>O dejada en el tubo de ensayo, dos veces más con porciones

de 2,1 ml de  $\text{CHCl}_3$ . Se combinaron las capas orgánicas y se secó bajo una corriente de nitrógeno.

5 *Extracción de fase sólida* – Se separaron las fracciones de TAG y LP del lípido bruto por SPE usando cartuchos de aminopropilo de 500 mg (Burdick & Jackson) puestos en un aparato Vac Elut. Se acondicionó el cartucho con 5 ml de hexano y se disolvieron 10 a 20 mg de cada muestra en 400  $\mu\text{l}$  de  $\text{CHCl}_3$  y se aplicaron al cartucho. Se lavó la columna con 4 ml de  $\text{CHCl}_3$ : alcohol isopropílico 2:1 (AIP) para eluir todos los lípidos neutros, que se recogieron y se secaron en nitrógeno. Después se eluyeron los ácidos grasos con 5 ml de ácido acético (HOAc) al 2% en éter, que se desechó. Se eluyó la porción de LP con 5 ml de MeOH, que se recogió y se secó en nitrógeno. Se volvió a disolver la fracción de lípidos neutra en 400  $\mu\text{l}$  de hexano y se aplicó a una segunda columna de aminopropilo (acondicionada previamente con 5 ml de hexano). Se eluyeron de ésteres de esteroles con 5 ml de acetato de etilo (EtOAc) al 1% en hexano y se desecharon. Finalmente, se eluyeron los TAG con 5 ml de EtOAc al 3% en hexano, que se recogieron y se secaron en nitrógeno.

10 *Análisis TLC* - Se realizó cromatografía de capa fina en placas de gel de sílice. Se eluyeron las placas usando un sistema disolvente que consistía en éter de petróleo : etil éter : ácido acético (80:20:1) y se visualizaron usando vapor de yodo.

15 *Análisis de ácidos grasos* – Se analizó en las muestras de biomasa, aceite bruto, fracciones aisladas de TAG y LP la composición de ácidos grasos como los FAME. Se pesaron las muestras directamente en tubos de ensayo con tapón de rosca y se añadió 1 ml de patrón interno C19:0 en tolueno y 2 ml de HCl 1,5 N en metanol a cada tubo. Se sometieron los tubos a agitación vorticial brevemente y se pusieron en un bloque térmico durante 2 horas a 100°C. Se retiraron los tubos del bloque térmico, se dejaron enfriar y se añadió 1 ml de NaCl saturado en agua. Se sometieron de nuevo los tubos a agitación vorticial, se centrifugó y se puso una porción de la capa de arriba (orgánica) en un vial de GC y se analizó por GC-FID. Se cuantificaron los FAME usando una curva de calibración de patrón interno de 3 puntos generada usando patrón de referencia GLC Nu-Chek-Prep y se identificaron provisionalmente basándose en tiempo de retención. Los ácidos grasos presentes se expresaron como mg/g y % de FAME total.

25 *ATCC 34304* – Se estimó que el contenido en lípidos de la biomasa ATCC 34304 era 9,1% como la suma de FAME y la cantidad de aceite bruto obtenida después de extracción de disolvente fue 9,2% en peso, dando una recuperación del 101% de grasa presente en la biomasa. Se determinó que el contenido en EPA y DHA de la biomasa era 4,8 mg/g y 38,7 mg/g, respectivamente. El aceite bruto extraído contenía 25,9 mg/g de EPA y 238,7 mg/g de DHA. El TAG aislado contenía 13,9 mg/g de EPA y 303,9 mg/g de DHA, mientras el LP aislado 38,7 mg/g de EPA y 237,980 mg/g de DHA. Los perfiles de ácidos grasos totales de la biomasa, aceite bruto extraído, fracción de TAG y fracción de LP se muestran a continuación en la Tabla 22 y Tabla 23 calculados como mg/g y % FAME, respectivamente.

Tabla 22: Perfil de ácidos grasos de ATCC 34304 calculado como miligramos por gramo.

	<b>Biomasa</b>	<b>Aceite bruto</b>	<b>TAG</b>	<b>LP</b>
<b>Ácido graso</b>	<b>FAME (mg/g)</b>	<b>FAME (mg/g)</b>	<b>FAME (mg/g)</b>	<b>FAME (mg/g)</b>
C12:0*	0,0	0,0	0,0	0,0
C14:0*	1,5	8,5	13,7	1,5
C14:1*	0,0	0,2	0,0	0,0
C15:0	0,0	0,0	0,0	0,0
C16:0*	20,8	138,9	250,8	73,9
C16:1*	0,2	2,9	6,9	0,3
C18:0*	2,1	17,8	45,6	0,8
C18:1 N9*	3,8	29,8	74,2	4,2
C18:1 N7	0,0	0,0	0,0	0,0

ES 2 602 121 T3

	<b>Biomasa</b>	<b>Aceite bruto</b>	<b>TAG</b>	<b>LP</b>
<b>Ácido graso</b>	<b>FAME (mg/g)</b>	<b>FAME (mg/g)</b>	<b>FAME (mg/g)</b>	<b>FAME (mg/g)</b>
C18:2 N6*	1,5	12,0	31,0	2,5
C20:0*	0,1	0,7	1,7	0,1
C18:3 N3*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:1 N9*	0,0	0,1	0,3	0,0
C 18:4 N3	0,0	8,5	0,3	0,0
C20:2 N6*	0,1	0,8	2,2	0,0
C20:3 N6	0,0	2,5	6,3	0,5
C22:0*	0,3	5,2	0,3	0,0
C20:4 N7	0,4	2,7	0,0	0,0
C20:3 N3	0,0	0,0	0,6	0,0
C20:4N6*	3,4	20,8	20,9	27,5
C22:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N5	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N3	0,1	0,6	1,3	0,3
C20:5 N3*	4,8	25,9	13,9	38,7
C24:0*	0,4	0,2	0,3	0,0
C22:4 N9	0,0	1,2	0,7	0,4
C24:1 N9*	0,9	6,9	18,2	0,8
C22:5 N6*	11,0	60,8	51,9	45,9
C22:5 N3*	0,4	3,1	6,8	1,0
C22:6 N3*	38,7	238,7	303,9	237,9
Suma de todo FAME	91,2	590,9	855,7	437,3

Tabla 23: Perfiles de ácidos grasos de ATCC 34304 calculados como un porcentaje de FAME total.

	<b>Biomasa</b>	<b>Aceite bruto</b>	<b>TAG</b>	<b>LP</b>
--	----------------	---------------------	------------	-----------

ES 2 602 121 T3

Ácido graso	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME
C12:0*	0,0	0,0	0,0	0,0
C14:0*	1,7	1,5	1,6	0,4
C14:1*	0,0	0,0	0,0	0,0
C15:0	0,0	0,0	0,0	0,0
C16:0*	22,8	24,2	29,3	16,9
C16:1*	0,2	0,5	0,8	0,1
C18:0*	2,3	3,1	5,3	0,2
C18:1 N9*	4,2	5,2	8,7	1,0
C1R:1 N7	0,0	0,0	0,0	0,0
C1R:2 N6*	1,6	2,1	3,6	0,6
C20:0*	0,1	0,1	0,2	0,0
C18:3 N3*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0
C18:4 N3	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:2 N6*	0,1	0,1	0,3	0,0
C20:3 N6	0,0	0,4	0,7	0,1
C22:0*	0,3	0,9	0,0	0,0
C20:4 N7	0,5	0,0	0,0	0,0
C20:3 N3	0,0	0,0	0,1	0,0
C20:4N6*	3,7	3,4	2,4	6,3
C22:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N5	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N3	0,1	0,1	0,2	0,1
C20:5 N3*	5,3	4,5	1,6	8,8
C24:0*	0,5	0,0	0,0	0,0
C22:4 N9	0,0	0,0	0,1	0,1

	<b>Biomasa</b>	<b>Aceite bruto</b>	<b>TAG</b>	<b>LP</b>
<b>Ácido graso</b>	<b>% FAME</b>	<b>% FAME</b>	<b>% FAME</b>	<b>% FAME</b>
C24:1 N9*	1,0	1,2	2,1	0,2
C22:5 N6*	12,1	10,5	6,1	10,5
C22:5 N3*	0,5	0,5	0,8	0,2
C22:6 N3*	42,5	41,5	35,5	54,4
Suma de % FAME	100,0	100,0	100,0	100,0

5 ATCC 20890 – Se estimó que el contenido en lípidos de la biomasa de ATCC 20890 era 9,2% como la suma de FAME y la cantidad de aceite bruto obtenida después de la extracción con disolvente fue 10,2% en peso, dando una recuperación del 111% de grasa presente en la biomasa. Se determinó que el contenido en EPA y DHA de la biomasa era 12,2 mg/g y 36,6 mg/g, respectivamente. El aceite bruto extraído contenía 64,7 mg/g de EPA y 194,2 mg/g de DHA. El TAG aislado contenía 41,9 mg/g de EPA y 230,2 mg/g de DHA, mientras que el LP aislado contenía 54,4 mg/g de EPA y 149,5 mg/g de DHA. Los perfiles de ácidos grasos totales de la biomasa, aceite bruto extraído, la fracción de TAG y la fracción de LP se muestran a continuación en la Tabla 24 y Tabla 25 calculados como mg/g y % FAME, respectivamente.

10 Tabla 24: Perfil de ácidos grasos de ATCC 20890 calculado como miligramos por gramo.

	<b>Biomasa</b>	<b>Aceite bruto</b>	<b>TAG</b>	<b>LP</b>
<b>Ácido graso</b>	<b>FAME (mg/g)</b>	<b>FAME (mg/g)</b>	<b>FAME (mg/g)</b>	<b>FAME (mg/g)</b>
C12:0*	0,0	0,0	0,0	0,0
C14:0*	0,6	5,2	22,6	3,2
C14:1*	0,0	0,0	0,0	0,2
C15:0	0,0	0,0	0,0	0,0
C16:0*	25,4	161,1	206,1	142,5
C16:1*	0,2	1,3	4,7	0,8
C18:0*	1,8	12,1	58,9	7,1
C18:1 N9*	1,0	9,7	37,6	2,4
C18:1 N7	0,0	0,0	0,0	0,0
C18:2 N6*	0,8	4,8	6,9	3,9
C20:0*	0,1	0,0	0,0	0,3
C18:3N3*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0

ES 2 602 121 T3

	<b>Biomasa</b>	<b>Aceite bruto</b>	<b>TAG</b>	<b>LP</b>
<b>Ácido graso</b>	<b>FAME (mg/g)</b>	<b>FAME (mg/g)</b>	<b>FAME (mg/g)</b>	<b>FAME (mg/g)</b>
C18:4 N3	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:2 N6*	1,9	11,1	14,2	13,1
C20:3 N6	1,0	5,4	2,4	8,0
C22:0*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N7	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 N3	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4N6*	5,3	33,6	35,8	35,3
C22:1N9*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N5	0,2	0,0	0,0	1,1
C20:4 N3	0,1	2,2	0,0	3,1
C20:5 N3*	12,2	64,7	41,9	54,4
C24:0*	0,3	0,0	0,0	0,2
C22:4 N9	0,0	0,0	0,0	0,0
C24:1 N9*	0,3	1,4	1,6	1,9
C22:5 N6*	0,5	2,4	1,4	3,0
C22:5 N3*	3,6	19,4	23,9	19,8
C22:6 N3*	36,6	194,2	230,2	149,5
<b>Suma de todo FAME</b>	<b>92,3</b>	<b>535,1</b>	<b>735,0</b>	<b>450,9</b>

ES 2 602 121 T3

Tabla 25: Perfiles de ácidos grasos de ATCC 20890 calculados como un porcentaje de FAME total.

	<b>Biomasa</b>	<b>Aceite crudo</b>	<b>TAG</b>	<b>LP</b>
<b>Ácido graso</b>	<b>% FAME</b>	<b>% FAME</b>	<b>% FAME</b>	<b>% FAME</b>
C12:0*	0,0	0,0	0,0	0,0
C14:0*	0,7	1,0	3,1	0,7
C14:1*	0,0	0,0	0,0	0,0
C15:0	0,0	0,0	0,0	0,0
C16:0*	27,6	30,1	28,0	31,6
C16:1*	0,2	0,3	0,6	0,2
C18:0*	2,0	2,3	8,0	1,6
C18:1 N9*	1,1	1,8	5,1	0,5
C18:1 N7	0,0	0,0	0,0	0,0
C18:2 N6*	0,9	0,9	0,9	0,9
C20:0*	0,1	0,0	0,0	0,1
C18:3 N3*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0
C18:4 N3	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:2 N6*	2,1	2,1	1,9	2,9
C20:3 N6	1,1	1,0	0,3	1,8
C22:0*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N7	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 N3	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N6*	5,8	6,3	4,9	7,8
C22:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N5	0,2	0,0	0,0	0,3
C20:4 N3	0,1	0,4	0,0	0,7
C20:5 N3*	13,2	12,1	5,7	12,1



	<b>Biomasa</b>	<b>Aceite crudo</b>	<b>TAG</b>	<b>LP</b>
<b>Ácido graso</b>	<b>% FAME</b>	<b>% FAME</b>	<b>% FAME</b>	<b>% FAME</b>
C24:0*	0,3	0,0	0,0	0,0
C22:4 N9	0,0	0,0	0,0	0,0
C24:1 N9*	0,3	0,3	0,2	0,4
C22:5 N6*	0,6	0,4	0,2	0,7
C22:5 N3*	3,9	3,6	3,2	4,4
C22:6 N3*	39,7	36,3	31,3	33,2
Suma de % FAME	100,00	100,0	100,0	100,0

ATCC 20889 – Se estimó que el contenido en lípidos de la biomasa era 3,3% como la suma de FAME y la cantidad de aceite bruto obtenida después de la extracción de disolvente fue 3,4% en peso, dando una recuperación del 103% de grasa presente en la biomasa. Se determinó que el contenido de EPA y DHA de la biomasa era 2,3 mg/g y 16,5 mg/g, respectivamente. El aceite bruto extraído contenía 26,8 mg/g de EPA y 205,1 mg/g de DHA. El TAG aislado contenía 7,3 mg/g de EPA y 185,9 mg/g de DHA, mientras que el LP aislado contenía 35,2 mg/g de EPA y 218,6 mg/g de DHA. Los perfiles de ácidos grasos totales de la biomasa, el aceite bruto extraído, la fracción TAG y la fracción LP se muestran a continuación en la Tabla 26 y Tabla 27 calculados como mg/g y % FAME, respectivamente.

5

10

Tabla 26: Perfil de ácidos grasos de ATCC 20889 calculado como miligramos por gramo.

	<b>Biomasa</b>	<b>Aceite crudo</b>	<b>TAG</b>	<b>LP</b>
<b>Ácido graso</b>	<b>FAME (mg/g)</b>	<b>FAME (mg/g)</b>	<b>FAME (mg/g)</b>	<b>FAME (mg/g)</b>
C12:0*	0,0	0,0	0,0	0,0
C14:0*	0,5	8,3	32,0	2,8
C14:1*	0,0	0,0	0,0	0,0
C15:0	0,0	0,0	0,0	0,1
C16:0*	6,6	80,3	150,8	50,4
C16:1*	0,1	1,7	12,3	0,0
C18:0*	0,3	4,8	9,7	1,6
C18:1 N9*	0,6	6,6	7,6	1,2
C18:1 N7	0,0	0,0	0,0	0,0
C18:2 N6*	0,0	0,4	1,1	0,1

ES 2 602 121 T3

	<b>Biomasa</b>	<b>Aceite crudo</b>	<b>TAG</b>	<b>LP</b>
<b>Ácido graso</b>	<b>FAME (mg/g)</b>	<b>FAME (mg/g)</b>	<b>FAME (mg/g)</b>	<b>FAME (mg/g)</b>
C20:0*	0,0	0,1	2,1	0,0
C18:3 N3*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0
C18:4 N3	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:2 N6*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 N6	0,0	0,1	0,7	0,1
C22:0*	0,0	0,0	0,1	0,0
C20:4 N7	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 N3	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4N6*	0,4	1,4	1,1	7,2
C22:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N5	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N3	0,0	0,5	0,9	0,5
C20:5 N3*	2,3	26,8	7,3	35,2
C24:0*	0,1	0,4	1,8	0,0
C22:4 N9	0,0	3,4	0,2	2,8
C24:1 N9*	0,0	0,0	0,8	0,3
C22:5 N6*	5,0	63,6	76,2	45,9
C22:5 N3*	0,2	1,8	2,2	2,0
C22:6 N3*	16,5	205,1	185,9	218,6
Suma de todo FAME	32,8	405,2	493,0	368,7

Tabla 27: Perfiles de ácidos grasos de ATCC 20889 calculados como un porcentaje de FAME total.

	<b>Biomasa</b>	<b>Aceite crudo</b>	<b>TAG</b>	<b>LP</b>
<b>Ácido graso</b>	<b>% FAME</b>	<b>% FAME</b>	<b>% FAME</b>	<b>% FAME</b>

ES 2 602 121 T3

	<b>Biomasa</b>	<b>Aceite crudo</b>	<b>TAG</b>	<b>LP</b>
<b>Ácido graso</b>	<b>% FAME</b>	<b>% FAME</b>	<b>% FAME</b>	<b>% FAME</b>
C12:0*	0,0	0,0	0,0	0,0
C14:0*	1,4	2,0	6,5	0,8
C14:1*	0,0	0,0	0,0	0,0
C15:0	0,0	0,0	0,0	0,0
C16:0*	20,3	19,8	30,6	13,7
C16:1*	0,4	0,4	2,5	0,0
C18:0*	0,8	1,2	2,0	0,4
C18:1 N9*	1,8	1,6	1,5	0,3
C18:1 N7	0,0	0,0	0,0	0,0
C18:2 N6*	0,1	0,1	0,2	0,0
C20:0*	0,0	0,0	0,4	0,0
C18:3 N3*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0
C18:4 N3	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:2 N6*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 N6	0,0	0,0	0,1	0,0
C22:0*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N7	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 N3	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N6*	1,3	0,4	0,2	2,0
C22:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N5	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N3	0,1	0,1	0,2	0,1
C20:5 N3*	7,0	6,6	1,5	9,5
C24:0*	0,3	0,1	0,4	0,0

	<b>Biomasa</b>	<b>Aceite crudo</b>	<b>TAG</b>	<b>LP</b>
<b>Ácido graso</b>	<b>% FAME</b>	<b>% FAME</b>	<b>% FAME</b>	<b>% FAME</b>
C22:4 N9	0,0	0,8	0,0	0,8
C24:1 N9*	0,0	0,0	0,2	0,1
C22:5 N6*	15,3	15,7	15,5	12,5
C22:5 N3*	0,5	0,5	0,5	0,5
C22:6 N3*	50,2	50,6	37,7	59,3
Suma de % FAME	100,0	100,0	100,0	100,0

5 ATCC 20892 – Se estimó que el contenido en lípidos de la biomasa era 8,8% como la suma de FAME y la cantidad de aceite bruto obtenida después de extracción de disolvente fue 12,1% en peso, dando una recuperación de 138% de grasa presente en la biomasa. Se determinó que el contenido en EPA y DHA de la biomasa era 8,3 mg/g y 43,3 mg/g, respectivamente. El aceite bruto extraído contenía 50,5 mg/g de EPA y 260,1 mg/g de DHA. El TAG aislado contenía 98,7 mg/g de EPA y 407,7 mg/g de DHA, mientras el LP aislado contenía 50,4 mg/g de EPA y 243,12 mg/g de DHA. Los perfiles de ácidos grasos totales de la biomasa, aceite bruto extraído, fracción de TAG y fracción de LP se muestran a continuación en la Tabla 28 y Tabla 29 calculados como mg/g y % FAME, respectivamente.

Tabla 28: Perfil de ácidos grasos de ATCC 20892 calculado como miligramos por gramo.

	<b>Biomasa</b>	<b>Aceite crudo</b>	<b>TAG</b>	<b>LP</b>
<b>Ácido graso</b>	<b>FAME (mg/g)</b>	<b>FAME (mg/g)</b>	<b>FAME (mg/g)</b>	<b>FAME (mg/g)</b>
C12:0*	0,0	0,0	0,0	0,0
C14:0*	7,3	42,2	29,7	54,7
C14:1*	0,0	0,0	0,0	0,2
C15:0	0,0	0,0	0,0	0,0
C16:0*	18,9	109,0	133,5	116,7
C16:1*	0,0	0,8	3,5	0,2
C18:0*	0,0	2,6	9,1	0,7
C18:1 N9*	0,6	7,3	22,0	1,3
C18:1 N7	0,0	0,0	0,0	0,0
C18:2 N6*	0,0	1,4	9,7	0,4
C20:0*	0,0	0,0	0,0	0,0
C18:3 N3*	0,0	0,0	0,0	0,0

ES 2 602 121 T3

	<b>Biomasa</b>	<b>Aceite crudo</b>	<b>TAG</b>	<b>LP</b>
<b>Ácido graso</b>	<b>FAME (mg/g)</b>	<b>FAME (mg/g)</b>	<b>FAME (mg/g)</b>	<b>FAME (mg/g)</b>
C20:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0
C 18:4 N3	0,0	0,6	0,0	0,1
C20:2 N6*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 N6	0,3	1,1	6,3	0,6
C22:0*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N7	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 N3	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N6*	1,3	7,6	15,8	7,8
C22:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N5	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N3	0,3	1,5	4,7	1,4
C20:5 N3	8,3	49,6	97,0	49,8
C24:0*	0,0	0,0	0,0	0,0
C22:4 N9	0,2	0,0	0,0	0,1
C24:1 N9*	0,0	1,1	4,9	1,0
C22:5 N6*	2,8	16,1	25,3	15,8
C22:5 N3*	1,1	6,6	23,9	6,0
C22:6 N3*	43,4	254,3	398,3	239,5
Suma de todo FAME	87,5	508,0	800,7	498,2

Tabla 29: Perfiles de ácidos grasos de ATCC 20892 calculados como un porcentaje de FAME total.

	<b>Biomasa</b>	<b>Aceite crudo</b>	<b>TAG</b>	<b>LP</b>
<b>Ácido graso</b>	<b>% FAME</b>	<b>% FAME</b>	<b>% FAME</b>	<b>% FAME</b>
C12:0*	0,0	0,0	0,0	0,0
C14:0*	8,3	8,3	3,6	11,0

ES 2 602 121 T3

	<b>Biomasa</b>	<b>Aceite crudo</b>	<b>TAG</b>	<b>LP</b>
<b>Ácido graso</b>	<b>% FAME</b>	<b>% FAME</b>	<b>% FAME</b>	<b>% FAME</b>
C14:1*	0,0	0,0	0,0	0,0
C15:0	0,0	0,0	0,0	0,0
C16:0*	21,6	21,4	16,4	23,4
C16:1*	0,0	0,2	0,5	0,0
C18:0*	0,0	0,5	1,1	0,1
C18:1 N9*	0,7	1,4	2,6	0,2
C18:1 N7	0,0	0,0	0,0	0,0
C18:2 N6*	0,0	0,2	1,1	0,1
C20:0*	0,0	0,1	0,6	0,0
C18:3 N3*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0
C18:4 N3	0,0	0,1	0,0	0,0
C20:2 N6*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 N6	0,3	0,2	0,7	0,1
C22:0*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N7	1,9	0,8	1,6	0,2
C20:3 N3	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N6*	1,4	1,5	1,9	1,6
C22:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N5	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 N3	0,3	0,3	0,5	0,3
C20:5 N3*	9,5	9,7	11,9	10,0
C24:0*	0,0	0,0	0,0	0,0
C22:4 N9	0,2	0,0	0,0	0,0
C24:1 N9*	0,0	0,2	0,5	0,2

ES 2 602 121 T3

	<b>Biomasa</b>	<b>Aceite crudo</b>	<b>TAG</b>	<b>LP</b>
<b>Ácido graso</b>	<b>% FAME</b>	<b>% FAME</b>	<b>% FAME</b>	<b>% FAME</b>
C22:5 N6*	3,2	3,1	3,0	3,2
C22:5 N3*	1,3	1,2	2,8	1,2
C22:6 N3*	49,6	49,8	49,0	48,0
Suma de % FAME	100,0	100,0	100,0	100,0

**Listado de secuencias**

- <110> Apt, Kirk  
Pfeifer III, Joseph W.  
Hansen, Jon Milton
- 5 Behrens, Paul Warren  
Zirkle, Ross  
Stahl, Tracey Lynn
- <120> Composiciones de ácidos grasos de traustoquítridos y métodos de fabricación y usos de las mismas.
- <130> 2715.003PC00
- 10 <140> Para asignar  
<141> Adjunto  
<160> 5  
<170> Patentin versión 3.3  
<210> 1
- 15 <211> 1713  
<212> ADN  
<213> Schizochytrium sp.



ES 2 602 121 T3

<400> 1  
acctggttga tcctgccagc tgtcatttgc tcgtctaaaa gattaagcca tgcattgtcta 60  
agtataaaca aattatacgg tgaaactgcg aacggctcat tatatcagtt atagtttctt 120  
tgatagtgta tttctatatac tatttggata actgtggcaa ttctagagct aacacatgct 180  
ttcgagtggg acttttttggg accactgcat ttattagatt ttgaagccaa cgtaaaaattg 240  
gtgattcatg ataactttgc gaatcgcagt agcgtcttgt acgcggcgat gaatcattca 300  
agtttctgcc ccatcagctg tcgatggtag ggtattggcc taccatggct ttcacgggtg 360  
acggagaatt agggtttgat tccggagagg acgcttgaga gacggcgacc acatccaagg 420  
aaggcagcag gcgcgtaaat tacccaatgg ggactccccg aggtagtgc aagaaataaa 480  
aatgaggagc gctttgcggt tttcaatttg aatgagagaa tcgtacaatc ctcatcgagg 540  
atcaattgga gggcaagtct ggtgccagca gccgcggtaa ctccagctcc aatagcaaat 600  
attagagttg ttgcagttaa aaagctcgta gttgaatttc cgatagtctt tggccgtgct 660  
cttggctctg tatcatgggt ttattgtgcc aagatgatcg tcctctatgg ttagtgatag 720  
tcatagtctg ttactgtaaa aaaactggag tgtttaaaagc atttctttgg gaaaggtaaa 780  
tattagtata ggataattag ataggacctg tgattcttat ttggttgggt tgtgagtcatt 840  
ggtaatgatt aatagggaca atcgggggta ttcgaattta attgtcagag gtgaaattct 900  
tggatttaag aaagtcgaac tactgcgaag gcatttacca aggatgtttt cattaataaa 960  
gaacgaaagt taggggatcg aagatgatta gataccatcg tagtcttaac tgtaaaactat 1020

ES 2 602 121 T3

gccgacttgc gattgtccgt cgttgttttt tcaaaaaaga gacctgggca gcagcacatg 1080  
 agaaatcaaa gtttttgggt tccgggggga gtatggtcgc aaggctgaaa cttaaaggaa 1140  
 ttgacggaag ggcaccacca ggagtggagc ctgcggtta attcgactca acacgggaaa 1200  
 acttaccagg tccagacata gtaaggattg acagattgag agctctttct tgattctatg 1260  
 ggtggtggtg catggccggt cttagtgggt ggagtgattt gtctggtaa ttccgtaac 1320  
 gaacgagacc tcagcctact aaatagtggg gcatattgtg agatatgtga caaaaatcgc 1380  
 ttcttagagg gacatttcgg gtttaccgga aggaagtttg aggcaataac aggtctgtga 1440  
 tgcccctaga tgttctgggc cgcacgcgcg ctacaatgac agattcaaca agtccggtag 1500  
 tggagctttt gcttctctat tattactttt ccgagaggaa tggttaatct tctaaatgtc 1560  
 tgtcgtgatg gggctagatt tttgcaatta ttaatctcca acgaggaatt cctagtaaac 1620  
 gcaagtcatc agcttgcatc gattacgtcc ctgccctttg tacacaccgc ccgtcgcacc 1680  
 taccgattga acggtcctat gaaatcttcg gat 1713

<210> 2

<211> 924

<212> ADN

5 <213> Schizochytrium sp.

ES 2 602 121 T3

<400> 2  
atcgaccaga aggatgccta cgtaggggac gaggcgcaga gcaagcgtgg tgtgctgacg 60  
ctcaagtacc cgatcgagca cggcatcgtg accaactggg acgacatgga gaagatctgg 120  
catcacacct tctacaacga gctgcgctg gcgcccagg agcaccctgt gctgctcacc 180  
gaggccccc tcaaccccaa ggcgaaccgc gagcgcatga cccagatcat gttcgagacc 240  
ttcaacgtgc cggccatgta cgtcaacatc caggccgtgc tgtccctgta cgcttcgggc 300  
cgcaccaccg gcgccgtgct cgattcggga gatggcgtca cgcacaccgt gccatctac 360  
gagggctacg cgctcccga cgcggtgctg cgcacgacc ttgctggccg cgacctgacc 420  
gactacatga tgaagatcct gacggagcgc gggctactgt tcacgacgac cgccgagcgc 480  
gaaatcgtgc gcgacatcaa ggagaagctg tgctacgtgg cgctcgactt cgaccaggag 540  
atgaagacgg ccgccgagtc gtcgctcgtg gagaagagct acgagctgcc ggacggcaac 600  
gtgatcacga tcggcaacga gcgcttcgc tgccccgagg tgctcttcca gccgtcgttc 660  
atcggcaagg aggccgccgg cgtgcacgag accatgttcc agacgatcat gaagtgcgac 720  
gtcgatatcc gcaaggacct gtacgccaac atcgtcatgt ccggtggctc caccatgtac 780  
gagggcatcg ccgcgcgcct ggagaaggag atggtgtcac tggcgcctc caccatgaag 840  
  
atcaaggtgg tcgcgcccc cgagcgcaag tactcgggtg ggatcggcgg ctccatcctg 900  
gcctcgtctt ccaccttcca gcaa 924

<210> 3

5 <211> 291

<212> PRT

<213> Schizochytrium sp.

<400> 3

Val Leu Thr Leu Lys Tyr Pro Ile Glu His Gly Ile Val Thr Asn Trp  
1 5 10 15

Asp Asp Met Glu Lys Ile Trp His His Thr Phe Tyr Asn Glu Leu Arg  
20 25 30

Val Ala Pro Glu Glu His Pro Val Leu Leu Thr Glu Ala Pro Leu Asn  
35 40 45

Pro Lys Ala Asn Arg Glu Arg Met Thr Gln Ile Met Phe Glu Thr Phe  
50 55 60

Asn Val Pro Ala Met Tyr Val Asn Ile Gln Ala Val Leu Ser Leu Tyr  
65 70 75 80

Ala Ser Gly Arg Thr Thr Gly Ala Val Leu Asp Ser Gly Asp Gly Val  
85 90 95

Thr His Thr Val Pro Ile Tyr Glu Gly Tyr Ala Leu Pro His Ala Val  
100 105 110

Leu Arg Ile Asp Leu Ala Gly Arg Asp Leu Thr Asp Tyr Met Met Lys  
115 120 125

Ile Leu Thr Glu Arg Gly Tyr Ser Phe Thr Thr Thr Ala Glu Arg Glu  
130 135 140

Ile Val Arg Asp Ile Lys Glu Lys Leu Cys Tyr Val Ala Leu Asp Phe  
145 150 155 160

Asp Gln Glu Met Lys Thr Ala Ala Glu Ser Ser Ser Leu Glu Lys Ser  
165 170 175

Tyr Glu Leu Pro Asp Gly Asn Val Ile Thr Ile Gly Asn Glu Arg Phe  
180 185 190

Arg Cys Pro Glu Val Leu Phe Gln Pro Ser Phe Ile Gly Lys Glu Ala  
 195 200 205

Ala Gly Val His Glu Thr Met Phe Gln Thr Ile Met Lys Cys Asp Val  
 210 215 220

Asp Ile Arg Lys Asp Leu Tyr Ala Asn Ile Val Met Ser Gly Gly Ser  
 225 230 235 240

Thr Met Tyr Glu Gly Ile Ala Ala Arg Leu Glu Lys Glu Met Val Ser  
 245 250 255

Leu Ala Pro Ser Thr Met Lys Ile Lys Val Val Ala Pro Pro Glu Arg  
 260 265 270

Lys Tyr Ser Val Trp Ile Gly Gly Ser Ile Leu Ala Ser Leu Ser Thr  
 275 280 285

Phe Gln Gln  
 290

<210> 4

<211> 918

<212> ADN

5 <213> Schizochytrium sp.

ES 2 602 121 T3

<400> 4  
gatctgcagc tggagcgcac caacgtgtac ttcaacgagg ccacggggcg cgcctacgtg 60  
ccgcgcgcca tcctcatgga cctggagccc ggtacgatgg actctgtccg cgccggcccc 120  
tttgccagc tcttccgccc agacaacttc gtcttcgggc agacggggcg cggtacaac 180  
tgggccaagg gccactacac tgagggcgcg gagcttatcg actcgggtgct cgacgtggtg 240  
cgcaaggagg cagagtcgtg cgactgcctg cagggcttcc agatcaccca ctcgctcggc 300  
ggcggcacgg gctccggtat gggcacgctt ctcatcagca agatccgcga ggagtacccc 360  
gaccgcatca tgctgacctt ctccatcgtg ccctcgccca aggtgtcggg caccgtcgtg 420  
gagccctaca acgcgacgct ctcggtgcac cagctcgtgg agaacgccga cgaggtcatg 480  
gtcctcgaca acgaggcgct gtacgacatc tgcttccgca ccttgaagct caccacgccc 540  
acctacggcg acctcaacca cctcgtgtgc gccgccatga ggggtgcac gtgctgcctg 600  
cgcttcccgg gccagctcaa ctccgacctg cgcaagctgg ccgtcaacct ggtgcccttt 660  
ccgcgcctcc acttcttcat gatcggcttc tcgcccctca cctcgcgtgg ctcgcagcag 720  
taccgcgccc tgaccgttcc ggagctcacg cagcaggcgt ttgacgctaa gaacatgatg 780  
  
tgcccccgg acccgcgcca cggccgctac ctgacggcga cgacgctctt ccgcggggcg 840  
atgtcgacca aggaggtgga cgagcagatg ctcaacatcc agaacaagaa ctcgtcgtac 900  
tttgtcgagt ggatcccc 918

<210> 5

<211> 307

<212> PRT

<213> Schizochytrium sp.

5

<400> 5

Asp Asp Leu Gln Leu Glu Arg Ile Asn Val Tyr Phe Asn Glu Ala Thr  
1 5 10 15

Gly Gly Arg Tyr Val Pro Arg Ala Ile Leu Met Asp Leu Glu Pro Gly  
20 25 30

Thr Met Asp Ser Val Arg Ala Gly Pro Phe Gly Gln Leu Phe Arg Pro  
35 40 45

Asp Asn Phe Val Phe Gly Gln Thr Gly Ala Gly Asn Asn Trp Ala Lys  
50 55 60

Gly His Tyr Thr Glu Gly Ala Glu Leu Ile Asp Ser Val Leu Asp Val  
65 70 75 80

Val Arg Lys Glu Ala Glu Ser Cys Asp Cys Leu Gln Gly Phe Gln Ile  
85 90 95

Thr His Ser Leu Gly Gly Gly Thr Gly Ser Gly Met Gly Thr Leu Leu  
100 105 110

Ile Ser Lys Ile Arg Glu Glu Tyr Pro Asp Arg Ile Met Leu Thr Phe  
115 120 125

Ser Ile Val Pro Ser Pro Lys Val Ser Asp Thr Val Val Glu Pro Tyr  
130 135 140

Asn Ala Thr Leu Ser Val His Gln Leu Val Glu Asn Ala Asp Glu Val  
145 150 155 160

Met Val Leu Asp Asn Glu Ala Leu Tyr Asp Ile Cys Phe Arg Thr Leu  
165 170 175

Lys Leu Thr Thr Pro Thr Tyr Gly Asp Leu Asn His Leu Val Cys Ala  
180 185 190

ES 2 602 121 T3

Ala Met Ser Gly Cys Thr Cys Cys Leu Arg Phe Pro Gly Gln Leu Asn  
 195 200 205

Ser Asp Leu Arg Lys Leu Ala Val Asn Leu Val Pro Phe Pro Arg Leu  
 210 215 220

His Phe Phe Met Ile Gly Phe Ser Pro Leu Thr Ser Arg Gly Ser Gln  
 225 230 235 240

Gln Tyr Arg Ala Leu Thr Val Pro Glu Leu Thr Gln Gln Ala Phe Asp  
 245 250 255

Ala Lys Asn Met Met Cys Ala Ala Asp Pro Arg His Gly Arg Tyr Leu  
 260 265 270

Thr Ala Thr Thr Leu Phe Arg Gly Arg Met Ser Thr Lys Glu Val Asp  
 275 280 285

Glu Gln Met Leu Asn Ile Gln Asn Lys Asn Ser Ser Tyr Phe Val Glu  
 290 295 300

Trp Ile Pro  
 305



## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un aceite microbiano que comprende una fracción de triglicéridos de al menos 70% en peso, en el que el contenido en ácido docosahexaenoico de la fracción de triglicéridos es al menos 40% en peso, en el que el contenido en ácido docosapentaenoico n-6 de la fracción de triglicéridos es de al menos 0,5% en peso a 6% en peso y en el que
- a) el contenido en ácido docosahexaenoico de la fracción de triglicéridos es al menos 50% en peso o
- b) la relación de ácido docosahexaenoico a ácido docosapentaenoico n-6 es mayor que 6:1.
2. El aceite microbiano según la reivindicación 1, en el que el contenido en ácido docosahexaenoico de la fracción de triglicéridos es al menos 50% en peso.
- 10 3. El aceite microbiano según la reivindicación 2, que comprende además un contenido en ácido araquidónico de la fracción de triglicéridos de 1,5% o menos en peso.
4. El aceite microbiano según la reivindicación 1, en el que la relación de ácido docosahexaenoico a ácido docosapentaenoico n-6 es mayor que 6:1.
- 15 5. El aceite microbiano de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que al menos 20% de los triglicéridos en la fracción de triglicéridos contiene ácido docosahexaenoico en dos posiciones en el triglicérido seleccionadas de dos cualesquiera de las posiciones sn-1, sn-2 y sn-3.
6. El aceite microbiano de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que al menos 5% de los triglicéridos en la fracción de triglicéridos contiene ácido docosahexaenoico en las tres de las posiciones sn-1, sn-2 y sn-3 en el triglicérido.
- 20 7. El aceite microbiano de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además 5% en peso o menos de ácido heptadecanoico.
8. El aceite microbiano de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además 10% en peso o menos de ácido eicosapentaenoico.
- 25 9. El aceite microbiano de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el aceite es un aceite bruto extraído de una biomasa de un microorganismo sin tratamiento adicional o un aceite refinado obtenido por tratamiento de un aceite microbiano bruto con etapas de tratamiento adicionales seleccionadas de refinado, blanqueo y desodorización.
10. El aceite microbiano según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el aceite es un aceite de traustoquítrido.
- 30 11. Un producto alimenticio, cosmético o composición farmacéutica para animales o seres humanos, que comprende el aceite microbiano de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
12. El producto alimenticio según la reivindicación 11, en el que el producto alimenticio es una fórmula infantil.
13. El producto alimenticio según la reivindicación 12, en el que la fórmula infantil es adecuada para bebés prematuros.
- 35 14. Una fórmula infantil que comprende el aceite de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, junto con un aceite físicamente refinado procedente de un microorganismo que produce ácido araquidónico.
15. Una fórmula infantil según la reivindicación 14, en la que el microorganismo es *Mortierella alpina* o *Mortierella* sect. *schmuckeri*.
- 40 16. Una fórmula infantil enriquecida con el aceite de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, junto con un aceite rico en ácido araquidónico.
17. El producto alimenticio según la reivindicación 11, en el que el producto alimenticio es leche, una bebida, una bebida terapéutica, una bebida nutricional o una combinación de las mismas.
18. El producto alimenticio según la reivindicación 11, en el que el producto alimenticio es un aditivo para alimento para animales o seres humanos.
- 45 19. El producto alimenticio según la reivindicación 11, en el que el producto alimenticio es un suplemento nutricional.
20. El producto alimenticio según la reivindicación 11, en el que el producto alimenticio es un pienso animal.
21. El pienso animal según la reivindicación 20, en el que el pienso animal es un pienso para acuicultura o en el que

el pienso animal es un pienso para animales domésticos, un pienso para animales de zoológico, un pienso para animales de trabajo, un pienso para ganado o una combinación de los mismos.