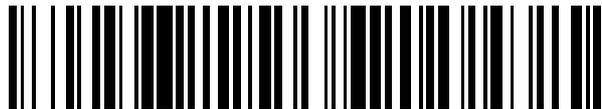


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 758 782**

51 Int. Cl.:

C12P 7/64 (2006.01)

C11B 1/00 (2006.01)

C11B 1/10 (2006.01)

C11B 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.06.2011 PCT/US2011/038768**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2011 WO11153246**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2011 E 11790339 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2019 EP 2576801**

54 Título: **Extracción de lípido de células y productos del mismo**

30 Prioridad:

15.03.2011 US 201161452721 P

01.06.2010 US 350363 P

31.08.2010 US 378923 P

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

06.05.2020

73 Titular/es:

DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)

Het Overloon 1

6411 TE Heerlen, NL

72 Inventor/es:

CHERINKO, STEPHEN, ROBERT;

KERTIS, ROBERT, CODY;

APT, KIRK, E.;

BEHRENS, PAUL, WARREN;

HANSEN, JON, MILTON;

PFEIFER, JOSEPH, W., III;

STAHL, TRACEY, LYNN;

ZIRKLE, ROSS;

BURKE, NASRIN TABAYEH;

RAMAN, KRISHNA y

LEININGER, NEIL FRANCIS

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 758 782 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

Extracción de lípido de células y productos del mismo

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a procesos para obtener un lípido de una célula lisando la célula, aumentando un pH de la célula y/o poniendo en contacto la célula con una sal, y separando el lípido. El alcance de protección se define por el proceso como se explica en las reivindicaciones.

Técnica anterior

10 Un proceso típico para obtener lípidos de una célula microbiana, tal como ácidos grasos poliinsaturados, implica cultivar los microorganismos que son capaces de producir el lípido deseado en un fermentador, estanque o biorreactor, separar el caldo de fermentación que comprende una biomasa de células microbianas, secar la biomasa de células microbianas, y separar los lípidos por extracción con disolvente. Las etapas en la separación pueden incluir diluir un caldo de fermentación con agua, centrifugar el caldo diluido, lisar las células microbianas, y extraer un lípido intracelular de las células lisadas añadiendo un disolvente inmiscible en agua a la mezcla en la que el lípido es soluble, por ejemplo, hexano.

15 Otro método de extracción para retirar un lípido de una célula microbiana es lisar una célula en un caldo de fermentación usando fuerza mecánica (por ejemplo, homogeneización), tratamiento enzimático, o tratamiento químico para romper las paredes celulares. El lípido se puede extraer de la composición resultante que comprende lípidos, biomasa de células microbianas y agua usando un disolvente orgánico, por ejemplo, alcohol isopropílico. El lípido se puede separar mecánicamente de la composición y el alcohol se debe retirar de tanto el lípido como la corriente residual de biomasa acuosa. Véase, por ejemplo, las publicaciones internacionales N° WO 01/76385 y WO 01/76715.

20 Sin embargo, la producción de lípidos a escala industrial usando cualquiera de los procesos anteriores requiere una gran cantidad de disolvente orgánico volátil e inflamable, creando así condiciones de operación peligrosas. El uso de disolventes orgánicos en el proceso de extracción también puede necesitar usar un sistema de recuperación de lípidos resistente a la explosión, que se añade así al coste de la recuperación de lípidos. Además, el uso de un disolvente orgánico en la extracción de lípido de una célula microbiana puede generar una corriente residual de disolvente orgánico que requiere un sistema completo de recuperación de disolvente o un método apropiado de deposición, que incrementa más el coste de producción global de la extracción de lípido. Por ejemplo, los estrictos límites sobre las emisiones de compuestos orgánicos volátiles (VOC) requieren más personal y coste añadido a los recipientes y otro equipo.

25 Por tanto, existe una necesidad de un proceso para obtener lípidos de una célula que no use un disolvente orgánico. Se han propuesto varios procesos para separar un lípido de una célula sin el uso de un disolvente orgánico. Por ejemplo, la patente de EE. UU. N° 6.750.048 desvela un proceso de lavado acuoso por el cual una emulsión se lava con disoluciones de lavado acuosas hasta que se obtiene un lípido sustancialmente no emulsionado. Sin embargo, en algunas realizaciones, este proceso requiere múltiples etapas de lavado, que requieren coste y tiempo sustanciales. La patente de EE. UU. N° 7.431.952 desvela un proceso por el cual células lisadas se centrifugan para retirar residuos de la pared celular y luego se extraen y purifican aceites. Sin embargo, este proceso proporciona un aceite en bruto que requiere una purificación más extensa. Así, lo que se necesita es un proceso que no utilice un disolvente volátil para extraer un lípido de una célula, y que se pueda realizar usando equipo fácilmente disponible y un número mínimo de etapas para proporcionar un lípido altamente puro.

30 El documento de patente US 5.476.787 desvela un proceso para la recuperación de hidrocarburos a partir de algas. El proceso de recuperación comprende calentar para lisar las células. Antes de calentar, el pH se puede ajustar hasta un valor de 7-14, preferentemente 8-10. Se desvela el uso de extracción con disolvente y/o destilación para recuperar el hidrocarburo liberado.

BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un proceso de obtención de un lípido de una célula microbiana, comprendiendo dicho proceso:

- a) lisar una célula para formar una composición de célula lisada;
- 50 b) añadir una base a la composición de célula lisada, aumentar el pH de la composición de célula lisada hasta 8 o por encima para desemulsionar la composición de célula;
- c) uno o más de c1, c2, c3 y c4;
- c1) añadir una sal a la composición de célula lisada hasta desemulsionar la composición de célula

c2) calentar la composición de célula lisada hasta desemulsionar la composición de célula

c3) agitar la composición de célula lisada hasta desemulsionar la composición de célula

c4) añadir una segunda base a la composición de célula lisada hasta desemulsionar la composición de célula;

5 y

d) separar un lípido de la composición de célula desemulsionada;

en donde el lípido contiene menos de 5 % en peso de un disolvente orgánico.

10 En algunas realizaciones, el proceso comprende añadir una sal a la composición de célula lisada hasta desemulsionar la composición de célula. En algunas realizaciones, la adición de una sal se realiza después de aumentar el pH.

En algunas realizaciones, el proceso comprende calentar la composición de célula lisada hasta desemulsionar la composición de célula. En algunas realizaciones, el calentamiento se realiza después de aumentar el pH.

15 En algunas realizaciones, el proceso comprende aumentar el pH de la composición de célula una segunda vez para desemulsionar la composición de célula. En algunas realizaciones, el aumentar el pH una segunda vez se realiza después de la adición de una sal o el calentamiento.

20 Se ha desvelado además un proceso de obtención de un lípido de una célula, comprendiendo el proceso lisar una célula para formar una composición de célula lisada, aumentar el pH de la composición de célula lisada hasta 8 o por encima para desemulsionar la composición de célula, añadir una sal a la composición de célula lisada hasta desemulsionar la composición de célula, y separar un lípido de la composición de célula desemulsionada, en donde el lípido contiene opcionalmente menos de 5 % en peso o volumen de un disolvente orgánico.

25 Se ha desvelado además un proceso de obtención de un lípido a partir de una composición de célula, comprendiendo el proceso aumentar el pH de la composición de célula hasta 8 o por encima para lisar la composición de célula y desemulsionar la composición de célula, añadir una sal a la composición de célula, y separar un lípido de la composición de célula desemulsionada, en donde el lípido contiene opcionalmente menos de 5 % en peso o volumen de un disolvente orgánico.

30 Se ha desvelado además un proceso de obtención de un lípido de una célula, comprendiendo el proceso lisar una célula para formar una composición de célula lisada, agitar la composición de célula para desemulsionar la composición de célula, y separar un lípido de la composición de célula desemulsionada, en donde el lípido contiene opcionalmente menos de 5 % en peso o volumen de un disolvente orgánico.

En algunas realizaciones, el proceso comprende además calentar la composición de célula lisada hasta desemulsionar la composición de célula. En algunas realizaciones, el calentamiento se realiza después de la adición de una sal.

En algunas realizaciones, el proceso comprende agitar la composición de célula lisada hasta desemulsionar la composición de célula. En algunas realizaciones, la agitación es durante 5 minutos a 96 horas.

35 En algunas realizaciones, la agitación comprende agitar la composición de célula con un impulsor que tiene una velocidad periférica de 350 centímetros por segundo a 900 centímetros por segundo.

40 El proceso según la invención comprende aumentar el pH de la composición de célula lisada hasta desemulsionar la composición de célula. Aumentar el pH de la composición de célula lisada hasta desemulsionar la composición de célula comprende añadir una base. En algunas realizaciones, se añade una segunda base después de la adición de una sal o calentamiento.

En algunas realizaciones, el calentamiento es durante 10 minutos a 96 horas.

En algunas realizaciones, la composición de célula se calienta hasta una temperatura de 60 °C a 100 °C. En algunas realizaciones, la composición de célula se calienta hasta una temperatura de 90 °C a 100 °C.

45 En algunas realizaciones, el aumentar el pH comprende añadir una base. En algunas realizaciones, la base tiene un pK_b de 1 a 12.

En algunas realizaciones, la separación de un lípido ocurre a una temperatura de 10 °C a 100 °C.

En algunas realizaciones, el proceso comprende agitar la composición de célula lisada removiendo, mezclando, combinando, agitando, vibrando, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el proceso comprende agitar la composición de célula lisada a 0,1 hp/1000 gal a 10 hp/1000 gal (0,0197 a 1,97 kW/m³) de composición de

célula lisada. En algunas realizaciones, el proceso comprende agitar la composición de célula lisada con un agitador que tiene una velocidad periférica del impulsor de 200 ft/min (1,016 m/s) a 1.000 ft/min (5,08 m/s).

5 En algunas realizaciones, el lisado comprende tratamiento mecánico, tratamiento físico, tratamiento químico, tratamiento enzimático, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el tratamiento mecánico es homogenización.

En algunas realizaciones, la sal se añade en una cantidad de 0,1 % a 20 % en peso de la composición de célula lisada. En algunas realizaciones, la sal se añade a la composición de célula lisada en una cantidad de 0,5 % a 15 % en peso de la composición de célula lisada. En algunas realizaciones, la sal se añade a la composición de célula lisada en una cantidad de 2 % a 10 % en peso de la composición de célula lisada.

10 En algunas realizaciones, la sal se selecciona del grupo que consiste en: sales de metales alcalinos, sales de metales alcalinotérreos, sales de sulfato, y combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, la sal es cloruro sódico. En algunas realizaciones, la sal es sulfato de sodio.

En algunas realizaciones, la separación comprende centrifugar. En algunas realizaciones, la separación comprende centrifugar a una temperatura de 30 °C a 90 °C.

15 En algunas realizaciones, el proceso proporciona un lípido que comprende al menos 50 % en peso de triglicérido.

En algunas realizaciones, el proceso proporciona un lípido que tiene un valor de anisidina de 26 o menos, 25 o menos, 20 o menos, 15 o menos, 10 o menos, 5 o menos, 2 o menos, o 1 o menos.

20 En algunas realizaciones, el proceso proporciona un lípido que tiene un valor de peróxido de 5 o menos, 4,5 o menos, 4 o menos, 3,5 o menos, 3 o menos, 2,5 o menos, 2 o menos, 1,5 o menos, 1 o menos, 0,5 o menos, 0,2 o menos, o 0,1 o menos.

25 En algunas realizaciones, el proceso proporciona un lípido que tiene un contenido de fósforo de 100 ppm o menos, 95 ppm o menos, 90 ppm o menos, 85 ppm o menos, 80 ppm o menos, 75 ppm o menos, 70 ppm o menos, 65 ppm o menos, 60 ppm o menos, 55 ppm o menos, 50 ppm o menos, 45 ppm o menos, 40 ppm o menos, 35 ppm o menos, 30 ppm o menos, 25 ppm o menos, 20 ppm o menos, 15 ppm o menos, 10 ppm o menos, 5 ppm o menos, 4 ppm o menos, 3 ppm o menos, 2 ppm o menos, o 1 ppm o menos.

30 En algunas realizaciones, el proceso proporciona un lípido que tiene al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, o al menos 50 % en peso de un ácido graso poliinsaturado (PUFA) deseado. En algunas realizaciones, el proceso proporciona un lípido que tiene al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, o al menos 50 % en peso de ácido docosahexaenoico ("DHA"), y/o al menos 10 %, al menos 15 %, o al menos 20 % en peso de ácido docosapentaenoico ("DPA n-6"), y/o al menos 10 %, al menos 15 %, o al menos 20 % en peso de ácido eicosapentaenoico ("EPA"), y/o al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, o al menos 50 % en peso de ácido araquidónico ("ARA").

35 En algunas realizaciones, el proceso comprende concentrar un caldo de fermentación que comprende la célula microbiana.

En algunas realizaciones, el proceso comprende lavar la célula o composición de célula.

En algunas realizaciones, el proceso comprende pasteurizar la célula o composición de célula.

En algunas realizaciones, el proceso comprende concentrar la composición de célula lisada.

40 En algunas realizaciones, el proceso comprende refinar el lípido. En algunas realizaciones, el refinado se selecciona del grupo que consiste en: refinado cáustico, desengomado, tratamiento con ácido, tratamiento con álcali, enfriamiento, calentamiento, blanqueamiento, desodorización, desacidificación, y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, el proceso comprende recoger el lípido, en donde la recogida comprende bombear el lípido sin agitación.

45 La presente divulgación también se refiere a un lípido obtenido por cualquiera de los procesos de la presente invención.

50 En algunas realizaciones, el lípido comprende uno o más ácidos grasos poliinsaturados. En algunas realizaciones, el lípido tiene al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, o al menos 50 % en peso de un PUFA deseado. En algunas realizaciones, el lípido tiene al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, o al menos 50 % en peso de DHA, y/o al menos 10 %, al menos 15 %, o al menos 20 % en peso de DPA n-6, y/o al menos 10 %, al menos 15 %, o al menos 20 % en peso de EPA, y/o al menos 10 %, al

menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, o al menos 50 % en peso de ARA.

En algunas realizaciones, el lípido tiene una intensidad de aroma global de 3 o menos. En algunas realizaciones, el lípido tiene una intensidad aromática global de 2 o menos.

5 En algunas realizaciones, el lípido comprende una fracción de triacilgliceroles de al menos 10 % en peso, en donde al menos 12 % en peso de los ácidos grasos en la fracción de triacilgliceroles es ácido eicosapentaenoico, en donde al menos 25 % en peso de los ácidos grasos en la fracción de triacilgliceroles es ácido docosahexaenoico, y en donde menos de 5 % en peso de los ácidos grasos en la fracción de triacilgliceroles es ácido araquidónico.

10 En algunas realizaciones, el lípido comprende al menos 20 % en peso de ácido eicosapentaenoico y menos de 5 % en peso de cada uno de ácido araquidónico, ácido docosapentaenoico n-6, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido eicosenoico, ácido erúxico y ácido estearidónico.

15 En algunas realizaciones, el lípido tiene un valor de anisidina de 26 o menos, 25 o menos, 20 o menos, 15 o menos, 10 o menos, 5 o menos, 2 o menos, o 1 o menos, y/o un valor de peróxido de 5 o menos, 4,5 o menos, 4 o menos, 3,5 o menos, 3 o menos, 2,5 o menos, 2 o menos, 1,5 o menos, 1 o menos, 0,5 o menos, 0,2 o menos, o 0,1 o menos, y/o un contenido de fósforo de 100 ppm o menos, 95 ppm o menos, 90 ppm o menos, 85 ppm o menos, 80 ppm o menos, 75 ppm o menos, 70 ppm o menos, 65 ppm o menos, 60 ppm o menos, 55 ppm o menos, 50 ppm o menos, 45 ppm o menos, 40 ppm o menos, 35 ppm o menos, 30 ppm o menos, 25 ppm o menos, 20 ppm o menos, 15 ppm o menos, 10 ppm o menos, 5 ppm o menos, 4 ppm o menos, 3 ppm o menos, 2 ppm o menos, o 1 ppm o menos.

20 En algunas realizaciones, el lípido es un lípido en bruto. En algunas realizaciones, el lípido en bruto tiene opcionalmente menos de 5 % en peso o volumen de un disolvente orgánico.

La presente divulgación también se refiere a un lípido microbiano en bruto que tiene un valor de anisidina de 26 o menos, un valor de peróxido de 5 o menos, un contenido de fósforo de 100 ppm o menos, y opcionalmente menos de 5 % en peso o volumen de un disolvente orgánico.

25 En algunas realizaciones, el lípido microbiano en bruto tiene un valor de anisidina de 26 o menos, 25 o menos, 20 o menos, 15 o menos, 10 o menos, 5 o menos, 2 o menos, o 1 o menos, y/o un valor de peróxido de 5 o menos, 4,5 o menos, 4 o menos, 3,5 o menos, 3 o menos, 2,5 o menos, 2 o menos, 1,5 o menos, 1 o menos, 0,5 o menos, 0,2 o menos, o 0,1 o menos, y/o un contenido de fósforo de 100 ppm o menos, 95 ppm o menos, 90 ppm o menos, 85 ppm o menos, 80 ppm o menos, 75 ppm o menos, 70 ppm o menos, 65 ppm o menos, 60 ppm o menos, 55 ppm o menos, 50 ppm o menos, 45 ppm o menos, 40 ppm o menos, 35 ppm o menos, 30 ppm o menos, 25 ppm o menos, 20 ppm o menos, 15 ppm o menos, 10 ppm o menos, 5 ppm o menos, 4 ppm o menos, 3 ppm o menos, 2 ppm o menos, o 1 ppm o menos.

35 En algunas realizaciones, el lípido microbiano en bruto tiene al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, o al menos 50 % en peso de un PUFA deseado. En algunas realizaciones, el lípido microbiano en bruto tiene al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, o al menos 50 % en peso de DHA, y/o al menos 10 %, al menos 15 %, o al menos 20 % en peso de DPA n-6, y/o al menos 10 %, al menos 15 %, o al menos 20 % en peso de EPA, y/o al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, o al menos 50 % en peso de ARA.

40 La presente divulgación también se refiere a un lípido microbiano extraído que comprende una fracción de triglicéridos de al menos 70 % en peso, en donde el contenido de ácido docosahexaenoico de la fracción de triglicéridos es al menos 50 % en peso, en donde el contenido de ácido docosapentaenoico n-6 de la fracción de triglicéridos es desde al menos 0,5 % en peso hasta 6 % en peso, y en donde el aceite tiene un valor de anisidina de 26 o menos.

45 La presente divulgación también se refiere a un lípido microbiano extraído que comprende una fracción de triglicéridos de al menos 70 % en peso, en donde el contenido de ácido docosahexaenoico de la fracción de triglicéridos es al menos 40 % en peso, en donde el contenido de ácido docosapentaenoico n-6 de la fracción de triglicéridos es desde al menos 0,5 % en peso hasta 6 % en peso, en donde la relación entre ácido docosahexaenoico y ácido docosapentaenoico n-6 es mayor que 6:1, y en donde el aceite tiene un valor de anisidina de 26 o menos.

50 La presente divulgación también se refiere a un lípido microbiano extraído que comprende una fracción de triglicéridos de al menos aproximadamente 70 % en peso, en donde el contenido de ácido docosahexaenoico de la fracción de triglicéridos es al menos 60 % en peso y en donde el aceite tiene un valor de anisidina de 26 o menos.

55 En algunas realizaciones, el lípido extraído tiene un valor de anisidina de 26 o menos, 25 o menos, 20 o menos, 15 o menos, 10 o menos, 5 o menos, 2 o menos, o 1 o menos, y/o un valor de peróxido de 5 o menos, 4,5 o menos, 4 o menos, 3,5 o menos, 3 o menos, 2,5 o menos, 2 o menos, 1,5 o menos, 1 o menos, 0,5 o menos, 0,2 o menos, o 0,1

o menos, y/o un contenido de fósforo de 100 ppm o menos, 95 ppm o menos, 90 ppm o menos, 85 ppm o menos, 80 ppm o menos, 75 ppm o menos, 70 ppm o menos, 65 ppm o menos, 60 ppm o menos, 55 ppm o menos, 50 ppm o menos, 45 ppm o menos, 40 ppm o menos, 35 ppm o menos, 30 ppm o menos, 25 ppm o menos, 20 ppm o menos, 15 ppm o menos, 10 ppm o menos, 5 ppm o menos, 4 ppm o menos, 3 ppm o menos, 2 ppm o menos, o 1 ppm o menos.

En algunas realizaciones, el lípido microbiano extraído es un lípido en bruto o un aceite en bruto. El lípido en bruto tiene menos de 5 % en peso o volumen de un disolvente orgánico.

La presente divulgación también se refiere a un proceso de obtención de un lípido, comprendiendo el proceso refinar un lípido en bruto de la presente divulgación. En algunas realizaciones, el refinado se selecciona del grupo que consiste en: refinado cáustico, desengomado, tratamiento con ácido, tratamiento con álcali, enfriamiento, calentamiento, blanqueamiento, desodorización, desacidificación, y combinaciones de los mismos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS/FIGURAS

Los dibujos adjuntos, que se incorporan en el presente documento y forman una parte de la memoria descriptiva, ilustran la presente invención y, junto con la descripción, sirven además para explicar los principios de la invención y para permitir que un experto en la técnica pertinente haga y use la invención.

Las **FIGs. 1-4** proporcionan diagramas de flujo esquemáticos que describen procesos de la presente invención.

La **FIG. 5** es un gráfico que proporciona la resonante electrónica paramagnética (EPR) con el tiempo de composiciones de célula lisada a diversos pHs.

La presente invención se describirá ahora con referencia a los dibujos adjuntos. En los dibujos, números de referencia similares indican elementos idénticos o funcionalmente similares. Además, el (los) dígito(s) más a la izquierda de un número de referencia pueden identificar el dibujo en el que primero aparece el número de referencia.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a un proceso de obtención de un lípido de una célula microbiana, comprendiendo dicho proceso:

- a) lisar una célula para formar una composición de célula lisada;
- b) añadir una base a la composición de célula lisada, aumentar el pH de la composición de célula lisada hasta 8 o por encima para desemulsionar la composición de célula;
- c) uno o más de c1, c2, c3 y c4;
 - c1) añadir una sal a la composición de célula lisada hasta desemulsionar la composición de célula
 - c2) calentar la composición de célula lisada hasta desemulsionar la composición de célula
 - c3) agitar la composición de célula lisada hasta desemulsionar la composición de célula
 - c4) añadir una segunda base a la composición de célula lisada hasta desemulsionar la composición de célula;

y

- d) separar un lípido de la composición de célula desemulsionada;

en donde el lípido contiene menos de 5 % en peso de un disolvente orgánico.

Se ha desvelado además un proceso de obtención de un lípido a partir de una composición de célula, comprendiendo el proceso aumentar el pH de la composición de célula hasta 8 o por encima para lisar la composición de célula y desemulsionar la composición de célula, añadir una sal a la composición de célula, y separar un lípido de la composición de célula desemulsionada, en donde el lípido contiene opcionalmente menos de 5 % en peso o volumen de un disolvente orgánico. En algunas realizaciones, el proceso comprende además uno o más de calentar la composición de célula para desemulsionar la composición de célula, agitar la composición de célula para desemulsionar la composición de célula, y aumentar el pH de la composición de célula una segunda vez para desemulsionar la composición de célula.

Se ha desvelado además un proceso de obtención de un lípido de una célula microbiana, comprendiendo el proceso lisar una célula microbiana para formar una composición de célula lisada, añadir una base a la composición de célula lisada hasta desemulsionar la composición de célula, y separar un lípido de la composición de célula desemulsionada, en donde el lípido contiene opcionalmente menos de 5 % en peso o volumen de un disolvente orgánico. En algunas realizaciones, el proceso comprende además uno o más de: añadir una sal a la composición

de célula lisada hasta desemulsionar la composición de célula, calentar la composición de célula lisada hasta desemulsionar la composición de célula, agitar la composición de célula lisada hasta desemulsionar la composición de célula, y añadir una segunda base a la composición de célula lisada hasta desemulsionar la composición de célula.

5 La presente divulgación también se refiere a un proceso de obtención de un lípido de una célula, comprendiendo el proceso lisar una célula para formar una composición de célula lisada, añadir una base a la composición de célula lisada hasta desemulsionar la composición de célula, añadir una sal a la composición de célula lisada hasta desemulsionar la composición de célula, y separar un lípido de la composición de célula desemulsionada, en donde el lípido contiene opcionalmente menos de 5 % en peso o volumen de un disolvente orgánico. La célula puede ser
10 una célula microbiana o una célula de semilla de aceite. En algunas realizaciones, el proceso comprende además uno o más de: calentar la composición de célula lisada hasta desemulsionar la composición de célula, agitar la composición de célula lisada hasta desemulsionar la composición de célula, y añadir una segunda base a la composición de célula lisada hasta desemulsionar la composición de célula.

15 La presente divulgación también se refiere a un proceso de obtención de un lípido de una célula, comprendiendo el proceso lisar una célula para formar una composición de célula lisada, agitar la composición de célula para desemulsionar la composición de célula, y separar un lípido de la composición de célula desemulsionada, en donde el lípido contiene opcionalmente menos de 5 % en peso o volumen de un disolvente orgánico.

La presente divulgación también se refiere a un lípido obtenido por cualquiera de los procesos de la presente invención.

20 La presente divulgación también se refiere a un proceso de extracción para obtener un lípido de una célula, comprendiendo el proceso lisar la célula para formar una composición de célula lisada, poner en contacto la composición de célula lisada con una primera base, poner en contacto la composición de célula lisada con una sal, calentar la composición de célula lisada durante 5 minutos a 96 horas, poner en contacto la composición de célula lisada con una segunda base, y separar un lípido de la composición de célula lisada a una temperatura de 10 °C a
25 100 °C.

La presente divulgación también se refiere a un proceso de extracción para la obtención de un lípido de una célula, comprendiendo el proceso lisar la célula para formar una composición de célula lisada, poner en contacto la composición de célula lisada con una sal, y agitar la composición de célula lisada durante 5 minutos a 96 horas para proporcionar una composición de célula lisada tratada, y separar un lípido de la composición de célula lisada tratada
30 a una temperatura de 10 °C a 100 °C.

La presente divulgación también se refiere a un proceso de extracción para la obtención de un lípido de una célula, comprendiendo el proceso lisar la célula para formar una composición de célula lisada, poner en contacto la composición de célula lisada con una sal, y separar un lípido de la composición de célula lisada a una temperatura de 10 °C a 100 °C.

35 En algunas realizaciones, la base o segunda base tienen un pK_b de 1 a 12. En algunas realizaciones, la base o segunda base tienen un pK_b de 3 a 5.

En algunas realizaciones, un proceso comprende agitar la composición de célula lisada durante 5 minutos a 96 horas, 10 minutos a 96 horas, 10 minutos a 4 horas, 12 horas a 84 horas, o 24 horas a 72 horas.

40 En algunas realizaciones, el proceso comprende agitar la composición de célula lisada removiendo, mezclando, combinando, agitando, vibrando, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el proceso comprende agitar la composición de célula lisada a 0,1 hp/1000 gal a 10 hp/1000 gal (0,0197 a 1,97 kW/m³) de composición de célula lisada. En algunas realizaciones, el proceso comprende agitar la composición de célula lisada con un agitador que tiene velocidad periférica del impulsor de 200 ft/min (1,016 m/s) a 1000 ft/min (5,08 m/s).

45 En algunas realizaciones, el lisado comprende un proceso seleccionado de: tratamiento mecánico, tratamiento físico, tratamiento químico, tratamiento enzimático, o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, la composición de célula lisada se pone en contacto con una sal en una cantidad de 0,1 % a 20 % en peso, 0,5 % a 15 % en peso, o 2 % a 10 % en peso de la composición de célula lisada.

50 En algunas realizaciones, la sal se selecciona del grupo que consiste en: sales de metales alcalinos, sales de metales alcalinotérreos, sales de sulfato y combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, la sal es cloruro sódico. En algunas realizaciones, la sal es sulfato de sodio.

En algunas realizaciones, el proceso comprende calentar la composición de célula lisada durante 5 minutos a 96 horas, 10 minutos a 4 horas, 12 horas a 84 horas, o 24 horas a 72 horas.

En algunas realizaciones, la separación comprende centrifugar. En algunas realizaciones, la separación comprende centrifugar a una temperatura de 10 °C a 100 °C.

En algunas realizaciones, el proceso comprende antes del lisado: lavar, centrifugar, evaporar, o una combinación de los mismos, un caldo que incluye la célula.

En algunas realizaciones, el proceso proporciona un lípido que tiene un valor de anisidina de 15 o menos. En algunas realizaciones, el proceso proporciona un lípido que comprende al menos 50 % en peso de triglicéridos.

- 5 En algunas realizaciones, el proceso no añade un disolvente orgánico a la composición de célula lisada. Los disolventes orgánicos incluyen disolventes polares, disolventes no polares, disolventes miscibles en agua, disolventes inmiscibles en agua, y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, el proceso comprende concentrar un caldo que comprende una célula. En algunas realizaciones, el proceso comprende concentrar la composición de célula lisada.

- 10 La presente divulgación también se refiere al lípido preparado por un proceso descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, el lípido comprende uno o más ácidos grasos poliinsaturados. En algunas realizaciones, el lípido tiene al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, o al menos 50 % en peso de un PUFA deseado. En algunas realizaciones, el lípido tiene al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, o al menos 50 % en peso de DHA, y/o al menos 10 %, al menos 15 %, o al menos 20 % en peso de DPA n-6, y/o al menos 10 %, al menos 15 %, o al menos 20 % en peso de EPA, y/o al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, o al menos 50 % en peso de ARA. En algunas realizaciones, el lípido tiene un valor de anisidina de 26 o menos, 25 o menos, 20 o menos, 15 o menos, 10 o menos, 5 o menos, 2 o menos, o 1 o menos, y/o un valor de peróxido de 5 o menos, 4,5 o menos, 4 o menos, 3,5 o menos, 3 o menos, 2,5 o menos, 2 o menos, 1,5 o menos, 1 o menos, 0,5 o menos, 0,2 o menos, o 0,1 o menos, y/o un contenido de fósforo de 100 ppm o menos, 95 ppm o menos, 90 ppm o menos, 85 ppm o menos, 80 ppm o menos, 75 ppm o menos, 70 ppm o menos, 65 ppm o menos, 60 ppm o menos, 55 ppm o menos, 50 ppm o menos, 45 ppm o menos, 40 ppm o menos, 35 ppm o menos, 30 ppm o menos, 25 ppm o menos, 20 ppm o menos, 15 ppm o menos, 10 ppm o menos, 5 ppm o menos, 4 ppm o menos, 3 ppm o menos, 2 ppm o menos, o 1 ppm o menos.

- En algunas realizaciones, el lípido comprende una fracción de triacilgliceroles de al menos 10 % en peso, en donde al menos 12 % en peso de los ácidos grasos en la fracción de triacilgliceroles es ácido eicosapentaenoico, en donde al menos 25 % en peso de los ácidos grasos en la fracción de triacilgliceroles es ácido docosahexaenoico, y en donde menos de 5 % en peso de los ácidos grasos en la fracción de triacilgliceroles es ácido araquidónico. En algunas realizaciones, el lípido tiene un valor de anisidina de 26 o menos, 25 o menos, 20 o menos, 15 o menos, 10 o menos, 5 o menos, 2 o menos, o 1 o menos, y/o un valor de peróxido de 5 o menos, 4,5 o menos, 4 o menos, 3,5 o menos, 3 o menos, 2,5 o menos, 2 o menos, 1,5 o menos, 1 o menos, 0,5 o menos, 0,2 o menos, o 0,1 o menos, y/o un contenido de fósforo de 100 ppm o menos, 95 ppm o menos, 90 ppm o menos, 85 ppm o menos, 80 ppm o menos, 75 ppm o menos, 70 ppm o menos, 65 ppm o menos, 60 ppm o menos, 55 ppm o menos, 50 ppm o menos, 45 ppm o menos, 40 ppm o menos, 35 ppm o menos, 30 ppm o menos, 25 ppm o menos, 20 ppm o menos, 15 ppm o menos, 10 ppm o menos, 5 ppm o menos, 4 ppm o menos, 3 ppm o menos, 2 ppm o menos, o 1 ppm o menos. En algunas realizaciones, el lípido es un lípido en bruto.

- En algunas realizaciones, el lípido comprende al menos 20 % en peso de ácido eicosapentaenoico y menos de 5 % en peso de cada uno de ácido araquidónico, ácido docosapentaenoico n-6, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido eicosenoico, ácido erúcido y ácido estearidónico. En algunas realizaciones, el lípido tiene un valor de anisidina de 26 o menos, 25 o menos, 20 o menos, 15 o menos, 10 o menos, 5 o menos, 2 o menos, o 1 o menos, y/o un valor de peróxido de 5 o menos, 4,5 o menos, 4 o menos, 3,5 o menos, 3 o menos, 2,5 o menos, 2 o menos, 1,5 o menos, 1 o menos, 0,5 o menos, 0,2 o menos, o 0,1 o menos, y/o un contenido de fósforo de 100 ppm o menos, 95 ppm o menos, 90 ppm o menos, 85 ppm o menos, 80 ppm o menos, 75 ppm o menos, 70 ppm o menos, 65 ppm o menos, 60 ppm o menos, 55 ppm o menos, 50 ppm o menos, 45 ppm o menos, 40 ppm o menos, 35 ppm o menos, 30 ppm o menos, 25 ppm o menos, 20 ppm o menos, 15 ppm o menos, 10 ppm o menos, 5 ppm o menos, 4 ppm o menos, 3 ppm o menos, 2 ppm o menos, o 1 ppm o menos. En algunas realizaciones, el lípido es un aceite en bruto.

- La presente divulgación también se refiere a un lípido microbiano en bruto que tiene un valor de anisidina de 26 o menos, un valor de peróxido de 5 o menos, un contenido de fósforo de 100 ppm o menos, y opcionalmente menos de 5 % en peso o volumen de un disolvente orgánico. En algunas realizaciones, el lípido microbiano en bruto tiene un valor de anisidina de 26 o menos, 25 o menos, 20 o menos, 15 o menos, 10 o menos, 5 o menos, 2 o menos o 1 o menos, y/o un valor de peróxido de 5 o menos, 4,5 o menos, 4 o menos, 3,5 o menos, 3 o menos, 2,5 o menos, 2 o menos, 1,5 o menos, 1 o menos, 0,5 o menos, 0,2 o menos, o 0,1 o menos, y/o un contenido de fósforo de 100 ppm o menos, 95 ppm o menos, 90 ppm o menos, 85 ppm o menos, 80 ppm o menos, 75 ppm o menos, 70 ppm o menos, 65 ppm o menos, 60 ppm o menos, 55 ppm o menos, 50 ppm o menos, 45 ppm o menos, 40 ppm o menos, 35 ppm o menos, 30 ppm o menos, 25 ppm o menos, 20 ppm o menos, 15 ppm o menos, 10 ppm o menos, 5 ppm o menos, 4 ppm o menos, 3 ppm o menos, 2 ppm o menos, o 1 ppm o menos. En algunas realizaciones, el lípido microbiano en bruto tiene al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, o al menos 50 % en peso de un PUFA deseado. En algunas realizaciones, el

5 lípido microbiano en bruto tiene al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, o al menos 50 % en peso de DHA, y/o al menos 10 %, al menos 15 %, o al menos 20 % en peso de DPA n-6, y/o al menos 10 %, al menos 15 %, o al menos 20 % en peso de EPA, y/o al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, o al menos 50 % en peso de ARA.

10 La presente divulgación también se refiere a un lípido microbiano extraído que comprende una fracción de triglicéridos de al menos 70 % en peso, en donde el contenido de ácido docosahexaenoico de la fracción de triglicéridos es al menos 50 % en peso, en donde el contenido de ácido docosapentaenoico n-6 de la fracción de triglicéridos es desde al menos 0,5 % en peso hasta 6 % en peso, y en donde el aceite tiene un valor de anisidina de 26 o menos. En algunas realizaciones, el lípido extraído tiene un valor de anisidina de 26 o menos, 25 o menos, 20 o menos, 15 o menos, 10 o menos, 5 o menos, 2 o menos, o 1 o menos, y/o un valor de peróxido de 5 o menos, 4,5 o menos, 4 o menos, 3,5 o menos, 3 o menos, 2,5 o menos, 2 o menos, 1,5 o menos, 1 o menos, 0,5 o menos, 0,2 o menos, o 0,1 o menos, y/o un contenido de fósforo de 100 ppm o menos, 95 ppm o menos, 90 ppm o menos, 85 ppm o menos, 80 ppm o menos, 75 ppm o menos, 70 ppm o menos, 65 ppm o menos, 60 ppm o menos, 55 ppm o menos, 50 ppm o menos, 45 ppm o menos, 40 ppm o menos, 35 ppm o menos, 30 ppm o menos, 25 ppm o menos, 20 ppm o menos, 15 ppm o menos, 10 ppm o menos, 5 ppm o menos, 4 ppm o menos, 3 ppm o menos, 2 ppm o menos, o 1 ppm o menos. En algunas realizaciones, el lípido extraído es un lípido en bruto.

20 La presente divulgación también se refiere a un lípido microbiano extraído que comprende una fracción de triglicéridos de al menos 70 % en peso, en donde el contenido de ácido docosahexaenoico de la fracción de triglicéridos es al menos 40 % en peso, en donde el contenido de ácido docosapentaenoico n-6 de la fracción de triglicéridos es desde al menos 0,5 % en peso hasta 6 % en peso, en donde la relación entre ácido docosahexaenoico y ácido docosapentaenoico n-6 es mayor que 6:1, y en donde el aceite tiene un valor de anisidina de 26 o menos. En algunas realizaciones, el lípido extraído tiene un valor de anisidina de 26 o menos, 25 o menos, 20 o menos, 15 o menos, 10 o menos, 5 o menos, 2 o menos, o 1 o menos, y/o un valor de peróxido de 5 o menos, 4,5 o menos, 4 o menos, 3,5 o menos, 3 o menos, 2,5 o menos, 2 o menos, 1,5 o menos, 1 o menos, 0,5 o menos, 0,2 o menos, o 0,1 o menos, y/o un contenido de fósforo de 100 ppm o menos, 95 ppm o menos, 90 ppm o menos, 85 ppm o menos, 80 ppm o menos, 75 ppm o menos, 70 ppm o menos, 65 ppm o menos, 60 ppm o menos, 55 ppm o menos, 50 ppm o menos, 45 ppm o menos, 40 ppm o menos, 35 ppm o menos, 30 ppm o menos, 25 ppm o menos, 20 ppm o menos, 15 ppm o menos, 10 ppm o menos, 5 ppm o menos, 4 ppm o menos, 3 ppm o menos, 2 ppm o menos, o 1 ppm o menos. En algunas realizaciones, el lípido extraído es un lípido en bruto.

35 La presente divulgación también se refiere a un lípido microbiano extraído que comprende una fracción de triglicéridos de al menos aproximadamente 70 % en peso, en donde el contenido de ácido docosahexaenoico de la fracción de triglicéridos es al menos 60 % en peso y en donde el aceite tiene un valor de anisidina de 26 o menos. En algunas realizaciones, el lípido extraído tiene un valor de anisidina de 26 o menos, 25 o menos, 20 o menos, 15 o menos, 10 o menos, 5 o menos, 2 o menos, o 1 o menos, y/o un valor de peróxido de 5 o menos, 4,5 o menos, 4 o menos, 3,5 o menos, 3 o menos, 2,5 o menos, 2 o menos, 1,5 o menos, 1 o menos, 0,5 o menos, 0,2 o menos, o 0,1 o menos, y/o un contenido de fósforo de 100 ppm o menos, 95 ppm o menos, 90 ppm o menos, 85 ppm o menos, 80 ppm o menos, 75 ppm o menos, 70 ppm o menos, 65 ppm o menos, 60 ppm o menos, 55 ppm o menos, 50 ppm o menos, 45 ppm o menos, 40 ppm o menos, 35 ppm o menos, 30 ppm o menos, 25 ppm o menos, 20 ppm o menos, 15 ppm o menos, 10 ppm o menos, 5 ppm o menos, 4 ppm o menos, 3 ppm o menos, 2 ppm o menos, o 1 ppm o menos. En algunas realizaciones, el lípido extraído es un lípido en bruto.

45 La presente divulgación también se refiere a un lípido en bruto extraído de un microorganismo de la especie *Cryptocodium cohnii*, que tiene un contenido de fósforo de 100 ppm o menos. En algunas realizaciones, el lípido en bruto tiene un valor de anisidina de 26 o menos, 25 o menos, 20 o menos, 15 o menos, 10 o menos, 5 o menos, 2 o menos, o 1 o menos, y/o un valor de peróxido de 5 o menos, 4,5 o menos, 4 o menos, 3,5 o menos, 3 o menos, 2,5 o menos, 2 o menos, 1,5 o menos, 1 o menos, 0,5 o menos, 0,2 o menos, o 0,1 o menos, y/o un contenido de fósforo de 100 ppm o menos, 95 ppm o menos, 90 ppm o menos, 85 ppm o menos, 80 ppm o menos, 75 ppm o menos, 70 ppm o menos, 65 ppm o menos, 60 ppm o menos, 55 ppm o menos, 50 ppm o menos, 45 ppm o menos, 40 ppm o menos, 35 ppm o menos, 30 ppm o menos, 25 ppm o menos, 20 ppm o menos, 15 ppm o menos, 10 ppm o menos, 5 ppm o menos, 4 ppm o menos, 3 ppm o menos, 2 ppm o menos, o 1 ppm o menos.

La presente divulgación también se refiere a un proceso de obtención de un lípido, comprendiendo el proceso refinar un lípido en bruto de la presente divulgación. En algunas realizaciones, el refinado se selecciona del grupo que consiste en: refinado cáustico, desengomado, tratamiento con ácido, tratamiento con álcali, enfriamiento, calentamiento, blanqueamiento, desodorización, desacidificación, y combinaciones de los mismos.

55 Visión general

60 Generalmente, los procesos de la presente invención no utilizan un disolvente orgánico para extraer o separar de otro modo un lípido. Así, en algunas realizaciones, un disolvente orgánico no se añade a un caldo de células que comprende material vegetal o caldo de fermentación que comprende una célula microbiana, ni se añade a una composición de célula, ni se añade a una composición de célula lisada, o ni se añade a un lípido durante un proceso de la presente invención en una cantidad o concentración suficiente para extraer un lípido. En algunas realizaciones,

un disolvente orgánico se puede añadir a una composición de célula, una composición de célula lisada, o una composición de célula desulsionada. En dichas realizaciones, el disolvente orgánico se añade en una concentración inferior a 5 %, inferior a 4 %, inferior a 3 %, inferior a 2 %, inferior a 1 %, inferior a 0,5 %, inferior a 0,1 %, o inferior a 0,05 % en volumen. Como se usa en el presente documento, un "disolvente orgánico" se refiere a un disolvente que incluye al menos un átomo de carbono. Como se usa en el presente documento, "disolvente" se refiere a un agente que es hidrófobo o lipófilo, y no es un lípido. Como se usa en el presente documento, "hidrófobo" se refiere a un agente que es repelido de una masa de agua. Como se usa en el presente documento, "lipófilo" se refiere a un agente que disuelve lípidos. Los disolventes orgánicos que no se usan en un proceso de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, disolventes polares, disolventes no polares, disolventes miscibles en agua, disolventes inmiscibles en agua, y combinaciones de los mismos. Los ejemplos no limitantes de disolventes orgánicos incluyen alquilos C₄-C₈ sustituidos y sin sustituir (por ejemplo, hexano y similares), cicloalquilos C₅-C₁₂, alquenos C₄-C₁₂, alcoholes C₁-C₈ (por ejemplo, iso-propanol y similares), aldehídos C₁-C₈, éteres C₄-C₈, ésteres C₁-C₈, arilos C₆-C₁₂, amidas C₁-C₈, heteroarilos C₅-C₁₂, y combinaciones de los mismos. Un disolvente orgánico como se define en el presente documento se puede añadir opcionalmente a una composición de célula lisada, por ejemplo, como un componente de una base y/o una sal para poner en contacto con la composición de célula lisada. Sin embargo, en dichas realizaciones, el disolvente orgánico está presente en una concentración tal que el lípido no es sustancialmente extraído de la composición de célula, composición de célula lisada, o composición de célula desulsionada por el disolvente (es decir, en una concentración inferior a 5 %, inferior a 4 %, inferior a 3 %, inferior a 2 %, inferior a 1 %, inferior a 0,5 %, inferior a 0,1 %, o inferior a 0,05 % en volumen o peso).

En algunas realizaciones, un proceso de la presente invención no incluye lavar, por ejemplo, con agua, o el proceso reduce el número de lavados de, una composición de célula lisada o una composición de célula desulsionada. "Lavar" se refiere a un proceso de diluir una composición con, por ejemplo, agua o tampón y retirar el agua o tampón, por ejemplo, por centrifugación. El lavado de una composición de célula puede disminuir el rendimiento global de un lípido obtenido de una célula. En la presente invención, el lavado se puede disminuir en 1 vez, 2 veces, 3 veces o más.

Definiciones

Como se usa en el presente documento, "lípido" o "aceite" se refiere a uno o más ácidos grasos (incluyendo ácidos grasos libres y ésteres de ácidos grasos), fosfolípidos, triacilgliceroles (es decir, triglicéridos), diacilglicéridos, monoacilglicéridos, lisofosfolípidos, jabones, fosfatidas, ceras, esteroides y ésteres de esteroles, carotenoides, xantófilas, hidrocarburos, y otros lípidos conocidos por un experto habitual en la técnica. Los lípidos incluyen lípidos polares y lípidos neutros.

Como se usa en el presente documento, "lípido polar" se refiere a lípidos que contienen un grupo polar y son más fácilmente solubles en disolventes polares. Los lípidos polares incluyen fosfolípidos. Como se usa en el presente documento, "fosfolípido" se refiere a lípidos que tienen un grupo fosfato. Como se usa en el presente documento, "lípido neutro" se refiere a lípidos que no contienen áreas de polaridad y son más fácilmente solubles en disolventes no polares. Los lípidos neutros incluyen triacilgliceroles (TAG).

Los ácidos grasos se clasifican basándose en la longitud y las características de saturación de la cadena de carbono. Los ácidos grasos se llaman ácidos grasos de cadena corta, cadena media, o cadena larga, basándose en el número de carbonos presentes en la cadena. Los ácidos grasos se llaman ácidos grasos saturados cuando no están presentes dobles enlaces entre los átomos de carbono, y se llaman ácidos grasos insaturados cuando están presentes dobles enlaces. Los ácidos grasos insaturados de cadena larga son monoinsaturados cuando solo está presente un doble enlace y son poliinsaturados cuando está presente más de un doble enlace.

Los ácidos grasos presentes en el lípido pueden tener 4 a 28 átomos de carbono. En algunas realizaciones, un lípido comprende uno o más ácidos grasos poliinsaturados. Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) se clasifican basándose en la posición del primer doble enlace del extremo metilo del ácido graso: los ácidos grasos omega-3 (n-3) contienen un primer doble enlace en el tercer carbono, mientras que los ácidos grasos omega-6 (n-6) contienen un primer doble enlace en el sexto carbono. Por ejemplo, el ácido docosahexaenoico ("DHA") es un ácido graso poliinsaturado omega-3 de cadena larga (LC-PUFA) con una longitud de cadena de 22 carbonos y 6 dobles enlaces, frecuentemente designados "22:6 n-3". A efectos de la presente solicitud, los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFAs) se definen como ácidos grasos de longitud de cadena de 18 y más carbonos, y preferentemente son ácidos grasos de longitud de cadena de 20 o más carbonos, que contienen 3 o más dobles enlaces. Los LC-PUFAs de la serie omega-6 incluyen, pero no se limitan a, ácido di-homo-gamma-linoleico (C20:3n-6), ácido araquidónico (C20:4n-6) ("ARA"), ácido docosatetraenoico o ácido adrenico (C22:4n-6), y ácido docosapentaenoico (C22:5n-6) ("DPA n-6"). Los LC-PUFAs de la serie omega-3 incluyen, pero no se limitan a, ácido eicosatrienoico (C20:3n-3), ácido eicosatetraenoico (C20:4n-3), ácido eicosapentaenoico (C20:5n-3) ("EPA"), ácido docosapentaenoico (C22:5n-3) y ácido docosahexaenoico (C22:6n-3). Los LC-PUFAs también incluyen ácidos grasos con más de 22 carbonos y 4 o más dobles enlaces que incluyen, pero no se limitan a, C24:6(n-3) y C28:8(n-3).

Los términos "ácido graso", "ácido graso poliinsaturado" y "PUFA" incluyen no solo la forma de ácido graso libre, sino también otras formas, tales como la forma de triacilglicerol (TAG), la forma de fosfolípido (PL) y otras formas

esterificadas. Como se usa en el presente documento, los términos "éster" y "esterificado" se refieren a la sustitución del hidrógeno en el grupo ácido carboxílico de una molécula de PUFA con otro sustituyente. Los ésteres típicos se conocen por los expertos en la técnica, una discusión de los cuales se proporciona por Higuchi, T. et al., *Prodrugs as Novel Delivery Systems*, Vol. 14, A.C.S. Symposium Series, *Bioreversible Carriers in Drug Design*, Edward B. Roche ed., Amer. Pharma. Assoc., Pergamon Press (1987), and *Protective Groups in Organic Chemistry*, McOmie ed., Plenum Press, New York (1973). Los ejemplos de ésteres comunes incluyen metilo, etilo, tricloroetilo, propilo, butilo, pentilo, *terc*-butilo, bencilo, nitrobencilo, metoxibencilo y benzhidrilo.

En algunas realizaciones, un lípido comprende al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 % o al menos 80 % en peso de PUFA. En algunas realizaciones, un lípido comprende al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 % o al menos 80 % en peso de DHA. En algunas realizaciones, un lípido comprende inferior a 50 %, inferior a 40 %, inferior a 30 %, inferior a 20 %, inferior a 15 %, inferior a 10 %, o menos de 5 % en peso de EPA. En algunas realizaciones, un lípido comprende inferior a 10 %, inferior a 5 %, inferior a 2 %, inferior a 1 %, o inferior a 0,5 % en peso de esteroides. En algunas realizaciones, uno o más PUFAs están presentes en un lípido en una o más formas, tales como triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos, fosfolípidos, ácidos grasos libres, ácidos grasos esterificados, sales de metales alcalinos de ácidos grasos, sales de metales alcalinotérreos de ácidos grasos, y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, un lípido separado después de centrifugar en un proceso de la presente invención comprende al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o 50 % a 95 %, 50 % a 90 %, 50 % a 85 %, 50 % a 80 %, 50 % a 75 %, 60 % a 95 %, 60 % a 90 %, 60 % a 85 %, 70 % a 95 %, 70 % a 90 %, 70 % a 85 %, 75 % a 95 %, 75 % a 90 %, o 75 % a 85 %, en peso de triglicéridos.

En algunas realizaciones, los triglicéridos comprenden al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 % o al menos 80 % en peso de DHA. En algunas realizaciones, los triglicéridos comprenden al menos 50 %, al menos 40 %, al menos 30 %, al menos 20 %, al menos 15 %, al menos 10 %, o al menos 5 % en peso de EPA.

Como se trata en el presente documento, el refinado adicional de un lípido después de centrifugar puede proporcionar un lípido que comprende al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 %, o 80 % a 99,5 %, 80 % a 99 %, 80 % a 97 %, 80 % a 95 %, 80 % a 90 %, 85 % a 99,5 %, 85 % a 99 %, 85 % a 97 %, 85 % a 95 %, 85 % a 90 %, 90 % a 99,5 %, 90 % a 99 %, 90 % a 97 %, 90 % a 95 %, 95 % a 99,5 %, 95 % a 99 %, 95 % a 97 %, 97 % a 99,5 %, o 98 % a 99,5 % de triglicérido en peso.

Como se usa en el presente documento, una "célula" se refiere a un biomaterial que contiene lípido, tal como biomaterial derivado de microorganismos. El aceite producido de microorganismos, tales como microorganismos oleaginosos, según los procesos descritos en el presente documento, también se denomina aceite vegetal. El aceite producido de algas y/o hongos también se denomina aceite de algas y/o fúngico, respectivamente.

Como se usa en el presente documento, una "célula microbiana" o "microorganismo" se refiere a organismos tales como algas, bacterias, hongos, protistas, y combinaciones de los mismos, por ejemplo, organismos unicelulares. En algunas realizaciones, una célula microbiana es una célula eucariota. Una célula microbiana adecuada para su uso con la presente invención incluye, pero no se limita a, algas doradas (por ejemplo, microorganismos del reino *Stramenopiles*), algas verdes, diatomeas, dinoflagelados (por ejemplo, microorganismos del orden *Dinophyceae* que incluyen miembros del género *Cryptocodinium* tales como, por ejemplo, *Cryptocodinium cohnii* o *C. cohnii*), levaduras (Ascomycetes o Basidiomycetes), y hongos de los géneros *Mucor* y *Mortierella*, que incluyen, pero no se limitan a, *Mortierella alpina* y *Mortierella sect. schmuckeri*. Una célula microbiana adecuada para su uso con la presente invención puede incluir además, pero no se limita a, géneros encontrados en los siguientes grupos de organismos: *Stramenopiles*, *Hamatores*, *Proteromonads*, *Opalines*, *Develpayella*, *Diplophrys*, *Labrinthulids*, *Thraustochytrids*, *Biosecids*, *Oomycetes*, *Hypochoytridiomycetes*, *Commation*, *Reticulosphaera*, *Pelagomonas*, *Pelagococcus*, *Ollicola*, *Aureococcus*, *Parmales*, *Diatoms*, *Xanthophytes*, *Phaeophytes*, *Eustigmatophytes*, *Raphidophytes*, *Synurids*, *Axodines* (incluyendo *Rhizochromulinales*, *Pedinellales*, *Dictyochales*), *Chrysomeridales*, *Sarcinochrysidales*, *Hydrurales*, *Hibberdiales* y *Chromulinales*.

En algunas realizaciones, una célula microbiana para su uso con la presente invención es un microorganismo del filo Labyrinthulomycota. En algunas realizaciones, una célula microbiana del filo Labyrinthulomycota es un traustocitridio, tal como un *Schizochytrium* o *Thraustochytrium*. Según la presente invención, el término "traustocitridio" se refiere a cualquier miembro del orden Thraustochytriales, que incluye la familia Thraustochytriaceae, y el término "labirintulido" se refiere a cualquier miembro del orden Labyrinthulales, que incluye la familia Labyrinthulaceae.

Se consideró previamente que los miembros de la familia Labyrinthulaceae eran miembros del orden Thraustochytriales, pero en revisiones más recientes de la clasificación taxonómica de dichos organismos, la familia Labyrinthulaceae se considera ahora que es un miembro del orden Labyrinthulales. Se considera que tanto los Labyrinthulales como los Thraustochytriales son miembros del filo Labyrinthulomycota. Los teoristas taxonómicos ponen ahora, en general, estos dos grupos de microorganismos con las algas o los protistas de tipo alga del linaje

Stramenopile. La actual colocación taxonómica de los traustoquitridios y labirintulidos se puede resumir del siguiente modo:

Reino: Stramenopila (Chromista)

Filo: Labyrinthulomycota (Heterokonta)

5 Clase: Labyrinthulomicetos (Labyrinthulae)

Orden: Labyrinthulales

Familia: Labyrinthulaceae

Orden: Thraustochytriales

Familia: Thraustochytriaceae

10 Para los fines de la presente invención, las cepas de células microbianas descritas como traustoquitridios incluyen los siguientes organismos: Orden: Thraustochytriales; Familia: Thraustochytriaceae; Género: *Thraustochytrium* (especies: sp., *arudimentale*, *aureum*, *benthicola*, *globosum*, *kinnei*, *motivum*, *multirudimentale*, *pachydermum*, *proliferum*, *roseum* y *striatum*), *Ulkenia* (especies: sp., *ameboidea*, *keruelensis*, *minuta*, *profunda*, *radiata*, *sailens*, *sarkariana*, *schizochytrids*, *visurgensis*, *yorkensis* y sp. BP-5601), *Schizochytrium* (especies: sp., *aggregatum*,
15 *limnaceum*, *mangrovei*, *minutum* y *octosporum*), *Japonochytrium* (especie: sp., *marinum*), *Aplanochytrium* (especie: sp., *haliotidis*, *keruelensis*, *profunda* y *stocchinoi*), *Althornia* (especie: sp., *crouchii*), o *Elina* (especie: sp., *marisalba*, y *sinorifica*). Para los fines de la presente invención, se considera que las especies descritas dentro de *Ulkenia* son miembros del género *Thraustochytrium*. *Aurantiacochytrium* y *Oblogospora* son dos géneros adicionales englobados por el filo Labyrinthulomycota en la presente invención. En algunas realizaciones, una célula microbiana es del
20 género *Thraustochytrium*, *Schizochytrium*, y mezclas de los mismos.

Las células microbianas adecuadas para su uso con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, Labirintulidos seleccionados de: Orden: Labyrinthulales, Familia: Labyrinthulaceae, Género: *Labyrinthula* (especies: sp., *algeriensis*, *coenocystis*, *chattonii*, *macrocystis*, *macrocystis atlantica*, *macrocystis macrocystis*, *marina*, *minuta*, *roscoffensis*, *valkanovii*, *vitellina*, *vitellina pacifica*, *vitellina vitellina* y *zopfii*), *Labyrinthuloides* (especies: sp., *haliotidis*, y *yorkensis*), *Labyrinthomyxa* (especie: sp., *marina*), *Diplophrys* (especie: sp., *archeri*), *Pyrrhosorus* (especie: sp., *marinus*), *Sorodiplophrys* (especie: sp., *stercorea*) y *Chlamydomyxa* (especie: sp., *labyrinthuloides* y *montana*) (aunque actualmente no hay un consenso sobre la exacta colocación taxonómica de *Pyrrhosorus*, *Sorodiplophrys* y *Chlamydomyxa*).

Las células hospedadoras del filo Labyrinthulomycota incluyen, pero no se limitan a, las cepas depositadas PTA-10212, PTA-10213, PTA-10214, PTA-10215, PTA-9695, PTA-9696, PTA-9697, PTA-9698, PTA-10208, PTA-10209, PTA-10210, PTA-10211, el microorganismo depositado como SAM2179 (denominado "Ulkenia SAM2179" por el depositante), cualquier especie de *Thraustochytrium* (que incluye las anteriores especies de *Ulkenia* tales como *U. visurgensis*, *U. amoeboida*, *U. sarkariana*, *U. profunda*, *U. radiata*, *U. minuta* y *Ulkenia* sp. BP-5601), y que incluyen *Thraustochytrium striatum*, *Thraustochytrium aureum*, *Thraustochytrium roseum*; y cualquier especie de *Japonochytrium*. Las cepas de *Thraustochytriales* incluyen, pero no se limitan a, *Thraustochytrium* sp. (23B) (ATCC 20891); *Thraustochytrium striatum* (Schneider) (ATCC 24473); *Thraustochytrium aureum* (Goldstein) (ATCC 34304); *Thraustochytrium roseum* (Goldstein) (ATCC 28210); *Japonochytrium* sp. (L1) (ATCC 28207); ATCC 20890; ATCC 20892; una cepa mutante derivada de cualquiera de los microorganismos anteriormente mencionados; y mezclas de los mismos. *Schizochytrium* incluye, pero no se limitan a, *Schizochytrium aggregatum*, *Schizochytrium limacinum*, *Schizochytrium* sp. (S31) (ATCC 20888), *Schizochytrium* sp. (S8) (ATCC 20889), *Schizochytrium* sp. (LC-RM) (ATCC 18915), *Schizochytrium* sp. (SR 21), cepa depositada ATCC 28209, cepa de *Schizochytrium limacinum* depositada IFO 32693, una cepa mutante derivada de cualquiera de los microorganismos anteriormente mencionados, y mezclas de los mismos. En algunas realizaciones, la célula hospedadora es un *Schizochytrium* o a *Thraustochytrium*. *Schizochytrium* se puede replicar tanto por bipartición sucesiva como formando esporangios, que por último lugar liberan zoosporas. *Thraustochytrium*, sin embargo, se replica solo formando esporangios, que entonces liberan zoosporas. En algunas realizaciones, la célula hospedadora de la invención es una célula hospedadora recombinante.

Las condiciones de cultivo eficaces para una célula microbiana para su uso con la invención incluyen, pero no se limitan a, medios eficaces, biorreactor, temperatura, pH, y condiciones de oxígeno que permiten la producción de lípidos. Un medio eficaz se refiere a cualquier medio en el que normalmente se cultiva una célula microbiana, por ejemplo, célula microbiana de Thraustochytriales. Dichos medios normalmente comprenden un medio acuoso que tiene carbono asimilable, nitrógeno y fuentes de fosfato, además de sales apropiadas, minerales, metales, y otros nutrientes, tales como vitaminas. Las células microbianas para su uso con la presente invención se pueden cultivar en biorreactores de fermentación convencionales, matraces con agitación, tubos de ensayo, placas de microtitulación y placas de Petri. En algunas realizaciones, el cultivo se lleva a cabo a una temperatura, pH, y contenido de oxígeno apropiados para una célula recombinante.

En algunas realizaciones, una célula microbiana es capaz de crecer a un nivel de salinidad de 12 g/L o menos, 5 g/L o menos, o 3 g/L o menos de cloruro sódico.

5 En algunas realizaciones, una célula microbiana produce un lípido que comprende PUFAs omega-3 y/o omega-6. En algunas realizaciones, una célula microbiana produce un lípido que comprende DHA, DPA (n-3), DPA (n-6), EPA, ácido araquidónico (ARA), o similares, y combinaciones de los mismos. Los ejemplos no limitantes de microorganismos que producen un lípido que comprende un PUFA se desvelan anteriormente y también se encuentran en las patentes de EE.UU. N° 5.340.594, 5.340.742 y 5.583.019.

10 En algunas realizaciones, una célula microbiana comprende al menos 30 % en peso de lípidos, al menos 35 % en peso de lípidos, al menos 40 % en peso de lípidos, al menos 50 % en peso de lípidos, al menos 60 % en peso de lípidos, al menos 70 % en peso de lípidos, o al menos 80 % en peso de lípidos. En algunas realizaciones, una célula microbiana para su uso con la presente invención es capaz de producir al menos 0,1 gramos por litro por hora (g/L/h) de DHA, al menos 0,2 g/L/h de DHA, al menos 0,3 g/L/h de DHA, o al menos 0,4 g/L/h de DHA.

Procesos

15 Los procesos de la presente invención comprenden lisar una célula o biomasa de células para formar una composición de célula lisada. Como se usa en el presente documento, el término "biomasa de células" se refiere a una población de células vegetales o microbianas. Como se usa en el presente documento, los términos "lisar" y "lisado" se refieren a un proceso de rotura de la pared celular y/o membrana celular de una célula. En algunas realizaciones, el lisado comprende un proceso tal como: tratar mecánicamente, tratar químicamente, tratar enzimáticamente, tratar físicamente, o combinaciones de los mismos.

20 Como se usa en el presente documento, tratar mecánicamente incluye, pero no se limita a, homogeneizar una célula, aplicar ultrasonidos a una célula, presionar en frío una célula, triturar una célula o similares, y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, un proceso comprende lisar la célula por homogeneización. En algunas realizaciones, un proceso comprende lisar la célula con un homogeneizador.

25 La homogeneización de una célula puede incluir, pero no se limita a, procesos que utilizan una prensa de presión de células French, un sonicador, un homogeneizador, un molino de bolas, un molino de varilla, un molino de guijarros, un molino de perlas, un rodillo de trituración a alta presión, un impactador de eje vertical, una mezcladora industrial, una mezcladora de alto cizallamiento, una mezcladora de palas, un homogeneizador politrónico, o similares, y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, una célula circula a través de un homogeneizador que es se calienta opcionalmente. En algunas realizaciones, la homogenización adecuada puede incluir 1 a 3 pases a través de un homogeneizador a o presiones altas y/o bajas. En algunas realizaciones, una presión durante la homogenización puede ser 150 bares a 1.400 bares, 150 bares a 1.200 bares, 150 bares a 900 bares, 150 bares a 300 bares, 300 bares a 1.400 bares, 300 bares a 1.200 bares, 300 bares a 900 bares, 400 bares a 800 bares, 500 bares a 700 bares, o 600 bares.

35 Como se usa en el presente documento, tratar físicamente puede incluir, pero no se limita a, calentar una célula, secar una célula, o similares, y combinaciones de los mismos.

40 Calentar una célula puede incluir, pero no se limita a, calentamiento resistivo, calentamiento por convección, calentamiento por vapor de agua, calentamiento en un baño fluido, calentamiento con energía solar, calentamiento con energía solar enfocada, y similares, cualquiera de los cuales se puede realizar en un tanque, piscina, tubo, conducto, matraz, u otro dispositivo de contención. En algunas realizaciones, una célula se calienta en un tanque que incluye bobinas resistivas en/sobre sus paredes. En algunas realizaciones, una célula se calienta en un baño líquido que incluye una tubería que pasa a su través.

45 Secar una célula puede incluir, pero no se limita a, exponer a flujo de aire, exponer a calor (por ejemplo, calor por convección, una superficie calentada, y similares), exponer a energía solar, secar por congelación (liofilizar), secar por pulverización, y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, secar comprende aplicar una célula a un tambor giratorio que opcionalmente se calienta.

Como se usa en el presente documento, tratar químicamente incluye, pero no se limita a, aumentar un pH de una célula, poner en contacto una célula con una sustancia química, o similares.

50 Aumentar un pH de una célula puede incluir, pero no se limita a, añadir una base a una composición de célula. En algunas realizaciones, las bases adecuadas para su uso con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, bases de hidróxido (por ejemplo, LiOH, NaOH, KOH, Ca(OH)₂, y similares, y combinaciones de los mismos), bases de carbonato (por ejemplo, Na₂CO₃, K₂CO₃, MgCO₃, y similares, y combinaciones de los mismos), bases de bicarbonato (por ejemplo, LiHCO₃, NaHCO₃, KHCO₃, y similares, y combinaciones de los mismos), y combinaciones de los mismos. Una base puede estar en forma de un sólido (por ejemplo, cristales, un gránulo, pellas, y similares) o un líquido (por ejemplo, una disolución acuosa, un disolución alcohólica tal como una base de hidróxido en metanol, etanol, propanol, y similares), y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el pH de la composición de célula se aumenta hasta 8 o por encima, 9 o por encima, 10 o por encima, 11 o por encima, 12 o por encima, o un

pH de 7 a 13, 7 a 12, 7 a 11, 7 a 10, 7 a 9, 8 a 13, 8 a 12, 8 a 11, 8 a 10, 8 a 9, 9 a 12, 9 a 11, 9 a 10, 10 a 12, o 10 a 11.

5 En algunas realizaciones, aumentar un pH de una célula puede incluir, pero no se limita a, realizar un proceso cloroalcalino. En algunas realizaciones, un caldo de fermentación que contiene cloruro sódico y una composición de célula se someten a electrólisis, que daría como resultado la formación de hidróxido sódico. La formación de hidróxido sódico aumenta el pH de la célula. En algunas realizaciones, un caldo de fermentación puede incluir cloruro de calcio o cloruro de potasio en lugar de o además de cloruro sódico. El someter dicho caldo de fermentación a electrólisis da como resultado la formación de hidróxido de calcio o hidróxido potásico, respectivamente, aumentándose así el pH de la célula.

10 Lisado enzimático se refiere a la lisis de una pared celular o membrana celular de una célula poniendo en contacto la célula con una o más enzimas. Las enzimas adecuadas para su uso con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, proteasas, celulasa, hemicelulasas, quitinasas, pectinasas, y combinaciones de las mismas. Los ejemplos no limitantes de proteasas incluyen serina proteasas, treonina proteasas, cisteína proteasas, aspartato proteasas, metaloproteasas, ácido glutámico proteasas, alcasa, y combinaciones de los mismos. Los ejemplos no limitantes de
15 celulastas incluyen sucrasa, maltasa, lactasa, alfa-glucosidasa, beta-glucosidasa, amilasa, lisozima, neuraminidasa, galactosidasa, alfa-manosidasa, glucuronidasa, hialuronidasa, pululanasa, glucocerebrosidasa, galactosilceramidasa, acetilgalactosaminidasa, fucosidasa, hexosaminidasa, iduronidasa, maltasa-glucoamilasa, y combinaciones de los mismos. Un ejemplo no limitante de una quitinasa incluye quitotriosidasa. Los ejemplos no limitantes de pectinasas incluyen pectoliasa, pectozima, poligalacturonasa, y combinaciones de los mismos. En
20 algunas realizaciones, algunas enzimas se activan calentando.

Como se usa en el presente documento, una "composición de célula lisada" se refiere a una composición que comprende una o más células lisadas, que incluyen residuo celular y otros contenidos de la célula, en combinación con un lípido (de las células lisadas), y opcionalmente, caldo que contenía células microbianas o material vegetal. En algunas realizaciones, una célula microbiana está contenida en un caldo de fermentación o medio que comprende la
25 célula microbiana y agua. En algunas realizaciones, una composición de célula lisada se refiere a una composición que comprende una o más células lisadas, residuo celular, un lípido, los contenidos naturales de la célula, y componentes acuosos de un caldo. En algunas realizaciones, una composición de célula lisada está en forma de una emulsión de aceite en agua que comprende una mezcla de una fase acuosa continua y una fase lipídica dispersada. En algunas realizaciones, una fase lipídica dispersada está presente en una concentración de 1 % a
30 60 %, 1 % a 50 %, 1 % a 40 %, 1 % a 30 %, 1 % a 20 %, 5 % a 60 %, 5 % a 50 %, 5 % a 40 %, 5 % a 30 %, 5 % a 20 %, 10 % a 60 %, 10 % a 50 %, 10 % a 40 %, 20 % a 60 %, 20 % a 50 %, 20 % a 40 %, 30 % a 60 %, 30 % a 50 %, o 40 % a 60 % en peso de una composición de célula lisada emulsionada.

Aunque no se está ligado a teoría particular alguna, se cree que los procesos de la presente invención descomponen o desemulsionan una composición de célula lisada emulsionada, que permite que se separe un lípido de la
35 composición de célula lisada. Como se usa en el presente documento, los términos "emulsión" y "emulsionado" se refieren a una mezcla de dos o más fases o capas inmiscibles en donde una fase o capa se dispersa en otra fase o capa. Como se usa en el presente documento, los términos "romper", "descomponer", "desemulsionar" "desemulsión", "desemulsionante" y "rotura" se refieren a un proceso de separación de fases o capas inmiscibles de una emulsión. Por ejemplo, el desemulsionar o romper una composición de célula lisada emulsionada se refiere a un
40 proceso por el que una composición de célula lisada emulsionada cambia de una emulsión que tiene una o más fases o capas a una composición que tiene dos o más fases o capas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un proceso de la presente invención rompe una composición de célula lisada emulsionada en una única fase a dos o más fases. En algunas realizaciones, las dos o más fases incluyen una fase lipídica y una fase acuosa. En algunas realizaciones, un proceso de la presente invención rompe una composición de célula lisada emulsionada de uno o
45 más fases en al menos tres fases. En algunas realizaciones, las tres fases incluyen una fase lipídica, una fase acuosa y una fase sólida. En algunas realizaciones, las tres fases incluyen una fase lipídica, una fase en emulsión, y una fase acuosa.

En algunas realizaciones, los procesos de la presente invención desemulsionan una composición de célula lisada para formar una composición de célula desemulsionada retirando o rompiendo al menos 75 % de la emulsión, al
50 menos 80 % de la emulsión, al menos 85 % de la emulsión, al menos 90 % de la emulsión, al menos 95 % de la emulsión, al menos 99 % de la emulsión. En algunas realizaciones, el proceso de la presente invención desemulsiona una composición de célula lisada retirando o rompiendo 75 % de la emulsión a 99 % de la emulsión, 75 % de la emulsión a 95 % de la emulsión, 75 % de la emulsión a 90 % de la emulsión, 75 % de la emulsión a 85 %
55 de la emulsión, 75 % de la emulsión a 80 % de la emulsión, 80 % de la emulsión a 99 % de la emulsión, 80 % de la emulsión a 95 % de la emulsión, 80 % de la emulsión a 90 % de la emulsión, 80 % de la emulsión a 85 % de la emulsión, 85 % de la emulsión a 99 % de la emulsión, 85 % de la emulsión a 95 % de la emulsión, 85 % de la emulsión a 90 % de la emulsión, 90 % de la emulsión a 99 % de la emulsión, 90 % de la emulsión a 95 % de la emulsión, o 95 % de la emulsión a 99 % de la emulsión en peso o volumen.

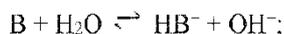
En algunas realizaciones, antes de lisar la célula, la célula se puede lavar y/o pasteurizar. En algunas realizaciones,
60 el lavado de la célula incluye usar una disolución acuosa, tal como agua, para retirar cualquier compuesto extracelular soluble en agua o dispersable en agua. En algunas realizaciones, la célula se puede lavar una vez, dos

veces, tres veces, o más. En algunas realizaciones, la pasteurización de la célula incluye calentar la célula para inactivar cualquier enzima no deseable, por ejemplo, cualquier enzima que pudiera degradar lípido o reducir el rendimiento de PUFAs. En algunas realizaciones, la célula se puede lavar primero y luego pasteurizar.

5 En algunas realizaciones, el tratamiento de una composición de célula lisada con una primera base rompe (es decir, desemulsiona) una composición de célula lisada emulsionada. En algunas realizaciones, tratar una composición de célula lisada con una segunda base rompe (es decir, desemulsiona) una composición de célula lisada emulsionada. En algunas realizaciones, tratar una composición de célula lisada con una sal rompe (es decir, desemulsiona) una composición de célula lisada emulsionada. En algunas realizaciones, calentar una composición de célula lisada rompe (es decir, desemulsiona) una composición de célula lisada emulsionada. En algunas realizaciones, agitar una
10 composición de célula lisada rompe (es decir, desemulsiona) una composición de célula lisada emulsionada. En algunas realizaciones, el calentar y agitar simultáneamente una composición de célula lisada rompe (es decir, desemulsiona) una composición de célula lisada emulsionada. En algunas realizaciones, uno o más de los tratamientos precedentes descompone (es decir, desemulsiona) una composición de célula lisada emulsionada.

15 El proceso de la invención comprende aumentar el pH de la composición de célula lisada hasta desemulsionar la composición de célula lisada. Aumentar el pH comprende poner en contacto la composición de célula lisada con una base. El proceso de la invención comprende poner en contacto la composición de célula lisada con una base para desemulsionar la composición de célula lisada. Como se usa en el presente documento, "poner en contacto" se refiere a combinar una composición de célula o una composición de célula lisada con una segunda composición (por ejemplo, añadiendo una composición a una composición de célula o una composición de célula lisada, añadiendo
20 una composición de célula o una composición de célula lisada hasta una composición, y similares). Como se usa en el presente documento, una "composición" puede comprender un material puro o incluir una combinación de dos o más materiales, sustancias, excipientes, porciones, y similares. Poner en contacto una composición de célula lisada con una primera base aumenta el pH de la composición de célula lisada. En algunas realizaciones, una composición de célula lisada se pone en contacto con una segunda base. En algunas realizaciones, el pH de una composición de
25 célula lisada o una composición de célula desemulsionada se aumenta una segunda vez. En algunas realizaciones, la segunda aumentación del pH comprende poner en contacto una composición de célula lisada o composición de célula desemulsionada con una segunda base. En algunas realizaciones, una composición de célula lisada se pone en contacto con una primera base, luego se calienta, agita, o una combinación de los mismos, y posteriormente se pone en contacto con una segunda base para proporcionar una emulsión de célula lisada tratada.

30 En algunas realizaciones, la primera base y/o segunda base tiene un pK_b de 1 a 12, 1 a 10, 1 a 8, 1 a 6, 1 a 5, 2 a 12, 2 a 10, 2 a 8, 2 a 6, 2 a 5, 3 a 10, 3 a 6, 3 a 5, 4 a 10, 4 a 8, 4 a 6, 5 a 10, o 5 a 8. Como se usa en el presente documento, el término " pK_b " se refiere a tal logaritmo negativo de la base constante de asociación, K_b , de la base. K_b se refiere a la constante de equilibrio para la ionización de la base en agua, en donde:



35 y

la K_b de base, B, se define como:

$$K_b = \frac{[HB^-][OH^-]}{[B]}.$$

Las bases adecuadas para su uso con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, bases de hidróxido (por ejemplo, LiOH, NaOH, KOH, Ca(OH)₂, y similares, y combinaciones de las mismas), bases de carbonato (por
40 ejemplo, Na₂CO₃, K₂CO₃, MgCO₃, y similares, y combinaciones de las mismas), bases de bicarbonato (por ejemplo, LiHCO₃, NaHCO₃, KHCO₃, y similares, y combinaciones de las mismas), y combinaciones de las mismas. Una base puede estar en forma de un sólido (por ejemplo, cristales, un gránulo, pellas, y similares) o un líquido (por ejemplo, una disolución acuosa, una disolución alcohólica tal como una base de hidróxido en metanol, etanol, propanol, y similares), y combinaciones de los mismos. Así, un disolvente puede estar opcionalmente presente en una base para
45 su uso con la presente invención. Como se usa en el presente documento, "disolvente" se refiere a un agente que es hidrófobo o lipófilo. Como se usa en el presente documento, "hidrófobo" se refiere a un agente que es repelido de una masa de agua. Como se usa en el presente documento, "lipófilo" se refiere a un agente que se disuelve en lípidos.

50 Poner en contacto la composición de célula lisada con una base aumenta el pH de la composición de célula lisada hasta 8 o por encima, 9 o por encima, 10 o por encima, 11 o por encima, 12 o por encima.

En algunas realizaciones, aumentar el pH de la composición de célula o composición de célula lisada con la adición de la base inhibe la oxidación de lípidos, minimizando así la cantidad de radicales libres en la composición de célula lisada de manera que el lípido en bruto obtenido de los procesos de la invención tenga un bajo valor de peróxido (por ejemplo, 5 o menos, 4,5 o menos, 4 o menos, 3,5 o menos, 3 o menos, 2,5 o menos, 2 o menos, 1,5 o menos, 1 o
55 menos, 0,5 o menos, 0,2 o menos, o 0,1 o menos) y/o un bajo valor de anisidina (por ejemplo, 26 o menos, 25 o menos, 20 o menos, 15 o menos, 10 o menos, 5 o menos, 2 o menos, o 1 o menos). Como se usa en el presente

documento, los términos "valor de peróxido" o "VP" se refiere a la medida de productos primarios de reacción, tales como peróxidos e hidroperóxidos, que ocurren durante la oxidación del lípido. Como se usa en el presente documento, el valor de peróxido se mide en meq/kg. Como se usa en el presente documento, los términos "valor de anisidina" o "VA" se refieren a la medida de productos secundarios de reacción, tales como aldehídos y cetonas, que ocurren durante la oxidación del lípido.

En algunas realizaciones, se detectan radicales libres en la composición de célula lisada después de ajustar el pH con una base usando un espectrómetro de resonancia paramagnética electrónica, por ejemplo, Bruker BioSpin e-scan EPR (número de sistema SC0274) (Bruker BioSpin, Billerica, MA). En algunas realizaciones, una muestra de la composición de célula lisada se diluye en una relación de aproximadamente 1:1 con agua desionizada antes de medir la EPR. En algunas realizaciones, para medir la EPR, se añade una sustancia química de trampa de espín a una muestra de la composición de célula lisada. En algunas realizaciones, la sustancia química de trampa de espín es cualquier sustancia química de trampa de espín conocida en la técnica, que incluye, pero no se limita a, POBN (α -(4-piridil 1-óxido)-N-terc-butilnitrona) o DMPO (*N*-óxido de 5,5-dimetil-1-pirrolina). En algunas realizaciones, la sustancia química de trampa de espín es aproximadamente 1,25 M y se añaden aproximadamente 50 μ L a aproximadamente 0,5 gramos de muestra de la composición de célula lisada. En algunas realizaciones, una muestra que contiene la sustancia química de trampa de espín se incuba a temperatura ambiente (por ejemplo, aproximadamente 20 °C). En algunas realizaciones, se usan los siguientes parámetros de espectrómetro: frecuencia de modulación de aproximadamente 86 Hz, amplitud de modulación de aproximadamente 2 gauss, potencia de microondas de aproximadamente 5 mW, constante de tiempo de aproximadamente 20 segundos, tiempo de barrido de aproximadamente 10 segundos, anchura de barrido de aproximadamente 100 gauss, y varios barridos de aproximadamente 8. La EPR se mide con el tiempo para determinar la concentración de radicales libres presentes en el lípido. En algunas realizaciones, la EPR se mide horariamente durante un transcurso de cuatro horas. En algunas realizaciones, la composición de célula lisada tiene una intensidad de señal de EPR (intensidad o amplitud) en los parámetros anteriormente enumerados de inferior a $0,15 \times 10^6$, inferior a $0,14 \times 10^6$, inferior a $0,13 \times 10^6$, inferior a $0,12 \times 10^6$, inferior a $0,11 \times 10^6$, inferior a $0,1 \times 10^6$, inferior a $0,09 \times 10^6$, inferior a $0,08 \times 10^6$, inferior a $0,07 \times 10^6$, inferior a $0,06 \times 10^6$, o inferior a $0,05 \times 10^6$ después de 4 horas. En algunas realizaciones, la composición de célula lisada tiene una EPR de $0,05 \times 10^6$ a $0,15 \times 10^6$, $0,05 \times 10^6$ a $0,14 \times 10^6$, $0,05 \times 10^6$ a $0,13 \times 10^6$, $0,05 \times 10^6$ a $0,12 \times 10^6$, $0,05 \times 10^6$ a $0,11 \times 10^6$, $0,05 \times 10^6$ a $0,1 \times 10^6$, $0,05 \times 10^6$ a $0,09 \times 10^6$, $0,07 \times 10^6$ a $0,15 \times 10^6$, $0,07 \times 10^6$ a $0,13 \times 10^6$, $0,07 \times 10^6$ a $0,11 \times 10^6$, $0,08 \times 10^6$ a $0,14 \times 10^6$, $0,08 \times 10^6$ a $0,12 \times 10^6$, $0,08 \times 10^6$ a $0,1 \times 10^6$, $0,09 \times 10^6$ a $0,13 \times 10^6$, o $0,09 \times 10^6$ a $0,11 \times 10^6$. En algunas realizaciones, el pH de la composición de célula lisada que da como resultado una EPR especificada anteriormente es 8 a 12, 8 a 11, 8 a 10, 8 a 9, 9 a 12, 9 a 11, 9 a 10, 10 a 12, o 10 a 11. En algunas realizaciones, una composición de célula lisada que tiene una intensidad de señal de EPR especificada anteriormente da como resultado un lípido en bruto que tiene un VA de 26 o menos, 25 o menos, 20 o menos, 15 o menos, 10 o menos, 5 o menos, 2 o menos, o 1 o menos. En algunas realizaciones, una composición de célula lisada que tiene una EPR especificada anteriormente da como resultado un lípido en bruto que tiene un VP de 5 o menos, 4,5 o menos, 4 o menos, 3,5 o menos, 3 o menos, 2,5 o menos, 2 o menos, 1,5 o menos, 1 o menos, 0,5 o menos, 0,2 o menos, o 0,1 o menos.

En algunas realizaciones, un proceso comprende poner en contacto una composición de célula o composición de célula lisada con una sal para desmenujar la composición de célula lisada. Como se usa en el presente documento, una "sal" se refiere a un compuesto iónico formado reemplazando un ión de hidrógeno de un ácido con un metal (por ejemplo, un metal alcalino, un metal alcalinotérreo, un metal de transición, y similares) o un compuesto positivamente cargado (por ejemplo, NH_4^+ y similares). Las sales adecuadas para su uso con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, sales de metales alcalinos, sales de metales alcalinotérreos, o similares, y combinaciones de los mismos. Las especies iónicas negativamente cargadas presentes en una sal para su uso con la presente incluyen, pero no se limitan a, haluros, sulfato, bisulfato, sulfito, fosfato, hidrógeno fosfato, dihidrogenofosfato, carbonato, bicarbonato, o similares, y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, una sal para su uso con la presente invención se selecciona de: cloruro sódico, sulfato de sodio, carbonato sódico, cloruro de calcio, sulfato de potasio, sulfato de magnesio, glutamato de monosodio, sulfato de amonio, cloruro de potasio, cloruro de hierro, sulfato de hierro, sulfato de aluminio, y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, una sal no incluye NaOH. Una sal se puede añadir como un sólido (por ejemplo, en forma cristalina, amorfa, peletizada y/o granulada), y/o como una disolución (por ejemplo, una disolución diluida, una disolución saturada, o una disolución supersaturada) que contiene, por ejemplo, agua, un alcohol, y similares, y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, la sal se añade en una cantidad de 5 g/l a 25 g/l, 5 g/l a 10 g/l, 10 g/l a 15 g/l, 15 g/l a 20 g/l, 20 g/l a 25 g/l, o 10 g/l a 20 g/l.

En algunas realizaciones, una temperatura de una composición de célula o una composición de célula lisada es inferior o igual a 60 °C, inferior o igual a 55 °C, inferior o igual a 45 °C, inferior o igual a 40 °C, inferior o igual a 35 °C, inferior o igual a 30 °C, o inferior o igual a 25 °C cuando se añade una sal para desmenujar la composición de célula o la composición de célula lisada. En algunas realizaciones, una temperatura de una composición de célula lisada es 0 °C a 60 °C, 0 °C a 55 °C, 0 °C a 50 °C, 0 °C a 45 °C, 0 °C a 40 °C, 0 °C a 35 °C, 0 °C a 30 °C, 0 °C a 25 °C, 20 °C a 60 °C, 20 °C a 55 °C, 20 °C a 50 °C, 20 °C a 45 °C, 20 °C a 40 °C, 20 °C a 35 °C, 20 °C a 30 °C, 30 °C a 60 °C, 30 °C a 55 °C, 30 °C a 50 °C, 30 °C a 45 °C, 30 °C a 40 °C, 30 °C a 40 °C, 40 °C a 60 °C, 40 °C a 55 °C,

40 °C a 50 °C, o 50 °C a 60 °C cuando una sal se añade para desemulsionar la composición de célula o la composición de célula lisada.

5 En algunas realizaciones, el proceso comprende poner en contacto una composición de célula o una composición de célula lisada con 20 % o menos, 15 % o menos, 10 % o menos, 7,5 % o menos, 5 % o menos, o 2 % o menos de sal en peso, de la composición de célula lisada o la composición de célula. En algunas realizaciones, un proceso comprende poner en contacto una composición de célula o una composición de célula lisada con 0,1 % a 20 %, 0,1 % a 15 %, 0,1 % a 10 %, 0,5 % a 20 %, 0,5 % a 15 %, 0,5 % a 10 %, 0,5 % a 5 %, 0,5 % a 4 %, 0,5 % a 3 %, 0,5 % a 2,5 %, 0,5 % a 2 %, 0,5 % a 1,5 %, 0,5 % a 1 %, 1 % a 20 %, 1 % a 15 %, 1 % a 10 %, 1 % a 5 %, 1 % a 4 %, 1 % a 3 %, 1 % a 2,5 %, 1 % a 2 %, 1 % a 1,5 %, 1,5 % a 5 %, 1,5 % a 4 %, 1,5 % a 3 %, 1,5 % a 2,5 %, 1,5 % a 2 %, 2 % a 20 %, 2 % a 15 %, 2 % a 10 %, 2 % a 5 %, 2 % a 4 %, 2 % a 3 %, 2 % a 2,5 %, 2,5 % a 5 %, 2,5 % a 4 %, 2,5 % a 3 %, 3 % a 5 %, 3 % a 4 %, 4 % a 5 %, 5 % a 20 %, 5 % a 15 %, 5 % a 10 %, 10 % a 20 %, 10 % a 15 %, o 15 % a 20 % de sal, en peso, de la composición de célula o composición de célula lisada (por ejemplo, un peso de caldo total). Por ejemplo, cuando una composición de célula lisada pesa 1.000 kg, poner en contacto con 0,5 % a 20 % de sal, en peso, requiere combinar 5 kg a 200 kg de sal con la composición de célula lisada.

15 En algunas realizaciones, el proceso comprende calentar una composición de célula o una composición de célula lisada hasta desemulsionar la composición de célula lisada. En algunas realizaciones, la composición de célula o la composición de célula lisada se calienta durante un periodo de tiempo suficiente para que una base y/o una sal desemulsione una composición de célula o una composición de célula lisada. En algunas realizaciones, el proceso comprende calentar una composición de célula o una composición de célula lisada durante al menos 5 minutos, al menos 10 minutos, al menos 20 minutos, al menos 30 minutos, al menos 1 hora, al menos 2 horas, al menos 4 horas, al menos 8 horas, al menos 12 horas, al menos 18 horas, al menos 24 horas, al menos 30 horas, al menos 36 horas, al menos 42 horas, al menos 48 horas, al menos 54 horas, al menos 60 horas, al menos 66 horas, al menos 72 horas, al menos 78 horas, al menos 84 horas, al menos 90 horas o al menos 96 horas. En algunas realizaciones, el proceso comprende calentar una composición de célula lisada durante 5 minutos a 96 horas, 5 minutos a 4 horas, 5 minutos a 2 horas, 5 minutos a 1 hora, 10 minutos a 4 horas, 10 minutos a 2 horas, 10 minutos a 1 hora, 1 hora a 96 horas, 1 hora a 84 horas, 1 hora a 72 horas, 1 hora a 60 horas, 1 hora a 48 horas, 1 hora a 36 horas, 1 hora a 24 horas, 1 hora a 4 horas, 4 horas a 96 horas, 4 horas a 84 horas, 4 horas a 72 horas, 4 horas a 60 horas, 4 horas a 48 horas, 4 horas a 36 horas, 4 horas a 24 horas, 8 horas a 96 horas, 8 horas a 84 horas, 8 horas a 72 horas, 8 horas a 60 horas, 8 horas a 48 horas, 8 horas a 36 horas, 8 horas a 24 horas, 8 horas a 12 horas, 12 horas a 96 horas, 12 horas a 84 horas, 12 horas a 72 horas, 12 horas a 60 horas, 12 horas a 48 horas, 12 horas a 36 horas, 12 horas a 24 horas, 24 horas a 96 horas, 24 horas a 84 horas, 24 horas a 72 horas, 24 horas a 60 horas, 24 horas a 48 horas, o 24 horas a 36 horas.

35 En algunas realizaciones, una composición de célula o una composición de célula lisada se puede calentar a una temperatura de al menos 10 °C, al menos 20 °C, al menos 25 °C, al menos 30 °C, al menos 35 °C, al menos 40 °C, al menos 45 °C, al menos 50 °C, al menos 55 °C, al menos 60 °C, al menos 65 °C, al menos 70 °C, al menos 75 °C, al menos 80 °C, al menos 85 °C, al menos 90 °C, al menos 95 °C, o al menos 100 °C. En algunas realizaciones, un proceso comprende calentar una composición de célula o una composición de célula lisada a una temperatura de 10 °C a 100 °C, 10 °C a 90 °C, 10 °C a 80 °C, 10 °C a 70 °C, 20 °C a 100 °C, 20 °C a 90 °C, 20 °C a 80 °C, 20 °C a 70 °C, 30 °C a 100 °C, 30 °C a 90 °C, 30 °C a 80 °C, 30 °C a 70 °C, 40 °C a 100 °C, 40 °C a 90 °C, 40 °C a 80 °C, 40 °C a 70 °C, 50 °C a 100 °C, 50 °C a 90 °C, 50 °C a 80 °C, 50 °C a 70 °C, 60 °C a 100 °C, 60 °C a 90 °C, 60 °C a 80 °C, 70 °C a 100 °C, 70 °C a 90 °C, 80 °C a 100 °C, 80 °C a 90 °C, o 90 °C a 100 °C. En algunas realizaciones, una sal se puede añadir a la composición de célula o la composición de célula lisada durante el calentamiento.

45 En algunas realizaciones, una composición de célula o una composición de célula lisada se puede calentar en un sistema cerrado o en un sistema con un evaporador. En algunas realizaciones, una composición de célula o composición de célula lisada se puede calentar en un sistema con un evaporador de forma que una porción del agua presente en la composición de célula o la composición de célula lisada se retire por evaporación. En algunas realizaciones, un proceso comprende calentar una composición de célula o una composición de célula lisada en un sistema con un evaporador para retirar hasta 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 % o 50 % en peso de agua presente en la composición de célula o composición de célula lisada. En algunas realizaciones, un proceso comprende calentar una composición de célula o una composición de célula lisada en un sistema con un evaporador para retirar 1 % a 50 %, 1 % a 45 %, 1 % a 40 %, 1 % a 35 %, 1 % a 30 %, 1 % a 25 %, 1 % a 20 %, 1 % a 15 %, 1 % a 10 %, 1 % a 5 %, 5 % a 50 %, 5 % a 45 %, 5 % a 40 %, 5 % a 35 %, 5 % a 30 %, 5 % a 25 %, 5 % a 20 %, 5 % a 15 %, 5 % a 10 %, 10 % a 50 %, 10 % a 45 %, 10 % a 40 %, 10 % a 35 %, 10 % a 30 %, 10 % a 25 %, 10 % a 20 %, 10 % a 15 %, 15 % a 50 %, 15 % a 45 %, 15 % a 40 %, 15 % a 35 %, 15 % a 30 %, 15 % a 25 %, 15 % a 20 %, 20 % a 50 %, 20 % a 45 %, 20 % a 40 %, 20 % a 35 %, 20 % a 30 %, 20 % a 25 %, 25 % a 50 %, 25 % a 45 %, 25 % a 40 %, 25 % a 35 %, 25 % a 30 %, 30 % a 50 %, 30 % a 45 %, 30 % a 40 %, 30 % a 35 %, 35 % a 50 %, 35 % a 45 %, 35 % a 40 %, 40 % a 50 %, 40 % a 45 %, o 45 % a 50 %.

60 En algunas realizaciones, el proceso comprende mantener una composición de célula o una composición de célula lisada en un recipiente durante un tiempo predeterminado para desemulsionar la composición de célula lisada. En algunas realizaciones, el proceso comprende mantener una composición de célula o una composición de célula lisada en un recipiente durante al menos 5 minutos, al menos 10 minutos, al menos 20 minutos, al menos 30 minutos, al menos 1 hora, al menos 2 horas, al menos 4 horas, al menos 8 horas, al menos 12 horas, al menos

18 horas, al menos 24 horas, al menos 30 horas, al menos 36 horas, al menos 42 horas, al menos 48 horas, al menos 54 horas, al menos 60 horas, al menos 66 horas, al menos 72 horas, al menos 78 horas, al menos 84 horas, al menos 90 horas o al menos 96 horas. En algunas realizaciones, el proceso comprende mantener una composición de célula o una composición de célula lisada durante 5 minutos a 96 horas, 5 minutos a 4 horas, 5 minutos a 2 horas, 5 minutos a 1 hora, 10 minutos a 4 horas, 10 minutos a 2 horas, 10 minutos a 1 hora, 1 hora a 96 horas, 1 hora a 84 horas, 1 hora a 72 horas, 1 hora a 60 horas, 1 hora a 48 horas, 1 hora a 36 horas, 1 hora a 24 horas, 1 hora a 4 horas, 4 horas a 96 horas, 4 horas a 84 horas, 4 horas a 72 horas, 4 horas a 60 horas, 4 horas a 48 horas, 4 horas a 36 horas, 4 horas a 24 horas, 8 horas a 96 horas, 8 horas a 84 horas, 8 horas a 72 horas, 8 horas a 60 horas, 8 horas a 48 horas, 8 horas a 36 horas, 8 horas a 24 horas, 8 horas a 12 horas, 12 horas a 96 horas, 12 horas a 84 horas, 12 horas a 72 horas, 12 horas a 60 horas, 12 horas a 48 horas, 12 horas a 36 horas, 12 horas a 24 horas, 24 horas a 96 horas, 24 horas a 84 horas, 24 horas a 72 horas, 24 horas a 60 horas, 24 horas a 48 horas, o 24 horas a 36 horas.

En algunas realizaciones, el proceso comprende poner en contacto un antioxidante con una emulsión de célula lisada. Los antioxidantes adecuados para su uso con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, un tocoferol, un tocotrienol, un polifenol, resveratrol, un flavonoide, un carotenoide, licopeno, un caroteno, luteína, ácido ascórbico, palmitato de ascorbilo, o similares, y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, el proceso comprende dejar reposar que una composición de célula lisada emulsionada, en donde el lípido se separa de la composición de célula lisada emulsionada usando gravedad.

Como se usa en el presente documento, los términos "agitar" y "agitación" se refieren a un proceso de afectar el movimiento en una composición de célula lisada mediante una aplicación de fuerza. En algunas realizaciones, el proceso de la invención comprende agitar una composición de célula o una composición de célula lisada removiendo, mezclando, combinando, agitando, vibrando, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el proceso de agitar una composición de célula o una composición de célula lisada desemulsiona la composición de célula o la composición de célula lisada.

En algunas realizaciones, el proceso de la invención comprende agitar una composición de célula lisada a 0,1 hp/1.000 gal a 10 hp/1.000 gal (0,0197 a 1,97 kW/m³), 0,5 hp/1.000 gal a 8 hp/1.000 gal (0,0985 a 1,576 kW/m³), 1 hp/1.000 gal a 6 hp/1.000 gal (0,197 a 1,182 kW/m³), o 2 hp/1.000 gal a 5 hp/1.000 gal (0,394 a 0,985 kW/m³) de composición de célula lisada.

En algunas realizaciones, el proceso de la invención comprende agitar una composición de célula o una composición de célula lisada usando un agitador. En algunas realizaciones, el agitador es un agitador de estilo dispersión que dispersa una base y/o sal en la composición de célula o la composición de célula lisada. En algunas realizaciones, un agitador tiene uno o más impulsores. Como se usa en el presente documento, "impulsor" se refiere a un dispositivo dispuesto para conferir movimiento a una composición de célula o una composición de célula lisada cuando gira. Los impulsores adecuados para su uso con la presente invención incluyen impulsores de hoja recta, impulsores Rushton de palas, impulsores de flujo axial, impulsores de flujo radial, impulsores de disco de hoja cóncava, impulsores de alta eficiencia, propulsores, palas, turbinas, o similares, y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, un proceso incluye agitar una composición de célula o una composición de célula lisada usando un agitador que tiene una velocidad periférica del impulsor de 90 ft/min a 1.200 ft/min (0,46 a 6,10 m/s), 200 ft/min a 1.000 ft/min (1,02 a 5,08 m/s), 300 ft/min a 800 ft/min (1,52 a 4,06 m/s), 400 ft/min a 700 ft/min (2,03 a 3,56 m/s), o 500 ft/min a 600 ft/min (2,54 a 3,05 m/s). En algunas realizaciones, un proceso incluye agitar una composición de célula o una composición de célula lisada usando un agitador que tiene un velocidad periférica del impulsor de 350 centímetros/segundo a 900 centímetros por segundo, 350 centímetros/segundo a 850 centímetros por segundo, 350 centímetros/segundo a 800 centímetros/segundo, 350 centímetros/segundo a 750 centímetros/segundo, 350 centímetros/segundo a 700 centímetros/segundo, 350 centímetros/segundo a 650 centímetros/segundo, 350 centímetros/segundo a 600 centímetros/segundo, 350 centímetros/segundo a 550 centímetros/segundo, 350 centímetros/segundo a 500 centímetros/segundo, 350 centímetros/segundo a 450 centímetros/segundo, 400 centímetros/segundo a 900 centímetros por segundo, 400 centímetros/segundo a 850 centímetros por segundo, 400 centímetros/segundo a 800 centímetros/segundo, 400 centímetros/segundo a 750 centímetros/segundo, 400 centímetros/segundo a 700 centímetros/segundo, 400 centímetros/segundo a 650 centímetros/segundo, 400 centímetros/segundo a 600 centímetros/segundo, 400 centímetros/segundo a 550 centímetros/segundo, 400 centímetros/segundo a 500 centímetros/segundo, 450 centímetros/segundo a 900 centímetros por segundo, 450 centímetros/segundo a 850 centímetros por segundo, 450 centímetros/segundo a 800 centímetros/segundo, 450 centímetros/segundo a 750 centímetros/segundo, 450 centímetros/segundo a 700 centímetros/segundo, 450 centímetros/segundo a 650 centímetros/segundo, 450 centímetros/segundo a 600 centímetros/segundo, 450 centímetros/segundo a 550 centímetros/segundo, 450 centímetros/segundo a 500 centímetros/segundo, 500 centímetros/segundo a 900 centímetros por segundo, 500 centímetros/segundo a 850 centímetros por segundo, 500 centímetros/segundo a 800 centímetros/segundo, 500 centímetros/segundo a 750 centímetros/segundo, 500 centímetros/segundo a 700 centímetros/segundo, 500 centímetros/segundo a 650 centímetros/segundo, 500 centímetros/segundo a 600 centímetros/segundo, 500 centímetros/segundo a 550 centímetros/segundo, 550 centímetros/segundo a 900 centímetros por segundo, 550 centímetros/segundo a 850 centímetros por segundo, 550 centímetros/segundo a 800 centímetros/segundo, 550 centímetros/segundo a

- 750 centímetros/segundo, 550 centímetros/segundo a 700 centímetros/segundo, 550 centímetros/segundo a 650 centímetros/segundo, 550 centímetros/segundo a 600 centímetros/segundo, 600 centímetros/segundo a 900 centímetros por segundo, 600 centímetros/segundo a 850 centímetros por segundo, 600 centímetros/segundo a 800 centímetros/segundo, 600 centímetros/segundo a 750 centímetros/segundo, 600 centímetros/segundo a 700 centímetros/segundo, 600 centímetros/segundo a 650 centímetros/segundo, 650 centímetros/segundo a 900 centímetros por segundo, 650 centímetros/segundo a 850 centímetros por segundo, 650 centímetros/segundo a 800 centímetros/segundo, 650 centímetros/segundo a 750 centímetros/segundo, 650 centímetros/segundo a 700 centímetros/segundo, 700 centímetros/segundo a 900 centímetros por segundo, 700 centímetros/segundo a 850 centímetros por segundo, 700 centímetros/segundo a 800 centímetros/segundo, 700 centímetros/segundo a 750 centímetros/segundo, 750 centímetros/segundo a 900 centímetros por segundo, 750 centímetros/segundo a 850 centímetros por segundo, 800 centímetros/segundo a 900 centímetros por segundo, 800 centímetros/segundo a 850 centímetros por segundo, o 850 centímetros/segundo a 900 centímetros/segundo. Como se usa en el presente documento, "velocidad periférica del impulsor" se refiere a la velocidad de la porción más externa del impulsor a medida que gira alrededor de su eje central.
- 15 En algunas realizaciones, la agitación (y opcionalmente etapas adicionales como se describen en el presente documento) se realiza en un recipiente que comprende un impulsor, en donde una relación entre el diámetro del impulsor y el volumen del recipiente es 0,1 a 0,5, 0,1 a 0,4, 0,2 a 0,5, 0,2 a 0,4, 0,3 a 0,5, o 0,3 a 0,4.
- 20 En algunas realizaciones, la agitación (y opcionalmente etapas adicionales como se describen en el presente documento) se realiza en un recipiente que comprende un impulsor, en donde una relación entre el diámetro del impulsor y el diámetro interno del recipiente es al menos 0,25, al menos 0,34, al menos 0,65, 0,25 a 0,65, 0,25 a 0,33, 0,3 a 0,6, 0,3 a 0,5, 0,3 a 0,4, 0,34 a 0,65, 0,34 a 0,6, 0,34 a 0,55, 0,37 a 0,55, 0,4 a 0,65, 0,4 a 0,6, 0,4 a 0,5, o 0,42 a 0,55.
- 25 En algunas realizaciones, la agitación comprende mezclar una composición de célula o una composición de célula lisada tal que la composición de célula o la composición de célula lisada se ponga bajo las condiciones de flujo descritas por un número de Reynolds de 10 a 10.000, 1.000 a 10.000, 1.500 a 10.000, o 2.000 a 10.000. En algunas realizaciones, una emulsión de célula lisada durante la agitación tiene un número de Reynolds de 2.000 o más, 3.000 o más, o 5.000 o más, o 2.000 a 10.000, 3.000 a 10.000, o 5.000 a 10.000.
- 30 En algunas realizaciones, un proceso comprende agitar una composición de célula o una composición de célula lisada durante al menos 5 minutos, al menos 10 minutos, al menos 20 minutos, al menos 30 minutos, al menos 1 hora, al menos 2 horas, al menos 4 horas, al menos 8 horas, al menos 12 horas, al menos 18 horas, al menos 24 horas, al menos 30 horas, al menos 36 horas, al menos 42 horas, al menos 48 horas, al menos 54 horas, al menos 60 horas, al menos 66 horas, al menos 72 horas, al menos 78 horas, al menos 84 horas, al menos 90 horas o al menos 96 horas. En algunas realizaciones, un proceso comprende agitar una composición de célula o una composición de célula lisada durante 5 minutos a 96 horas, 5 minutos a 4 horas, 5 minutos a 2 horas, 5 minutos a 1 hora, 10 minutos a 4 horas, 10 minutos a 2 horas, 10 minutos a 1 hora, 1 hora a 96 horas, 1 hora a 84 horas, 1 hora a 72 horas, 1 hora a 60 horas, 1 hora a 48 horas, 1 hora a 36 horas, 1 hora a 24 horas, 1 hora a 4 horas, 4 horas a 96 horas, 4 horas a 84 horas, 4 horas a 72 horas, 4 horas a 60 horas, 4 horas a 48 horas, 4 horas a 36 horas, 4 horas a 24 horas, 8 horas a 96 horas, 8 horas a 84 horas, 8 horas a 72 horas, 8 horas a 60 horas, 8 horas a 48 horas, 8 horas a 36 horas, 8 horas a 24 horas, 8 horas a 12 horas, 12 horas a 96 horas, 12 horas a 84 horas, 12 horas a 72 horas, 12 horas a 60 horas, 12 horas a 48 horas, 12 horas a 36 horas, 12 horas a 24 horas, 20 horas a 40 horas, 24 horas a 96 horas, 24 horas a 84 horas, 24 horas a 72 horas, 24 horas a 60 horas, 24 horas a 48 horas, o 24 horas a 36 horas.
- 35 En algunas realizaciones, un proceso comprende agitar y calentar simultáneamente una composición de célula o una composición de célula lisada hasta desmenujar la composición de célula o la composición de célula lisada.
- 45 En algunas realizaciones, un proceso comprende agitar una composición de célula o una composición de célula lisada a una temperatura de al menos 10 °C, al menos 20 °C, al menos 25 °C, al menos 30 °C, al menos 35 °C, al menos 40 °C, al menos 45 °C, al menos 50 °C, al menos 55 °C, al menos 60 °C, al menos 65 °C, al menos 70 °C, al menos 75 °C, al menos 80 °C, al menos 85 °C, al menos 90 °C, al menos 95 °C, o al menos 100 °C. En algunas realizaciones, un proceso comprende agitar una composición de célula o una composición de célula lisada a una temperatura de 10 °C a 100 °C, 10 °C a 90 °C, 10 °C a 80 °C, 10 °C a 70 °C, 20 °C a 100 °C, 20 °C a 90 °C, 20 °C a 80 °C, 20 °C a 70 °C, 30 °C a 100 °C, 30 °C a 90 °C, 30 °C a 80 °C, 30 °C a 70 °C, 40 °C a 100 °C, 40 °C a 90 °C, 40 °C a 80 °C, 50 °C a 100 °C, 50 °C a 90 °C, 50 °C a 80 °C, 50 °C a 70 °C, 60 °C a 100 °C, 60 °C a 90 °C, 60 °C a 80 °C, 70 °C a 100 °C, 70 °C a 90 °C, 80 °C a 100 °C, 80 °C a 90 °C, o 90 °C a 100 °C.
- 50 En algunas realizaciones, las diversas combinaciones de formar una composición de célula lisada, poner en contacto una composición de célula lisada con una base o aumentar el pH de una composición de célula lisada, poner en contacto una composición de célula lisada con una sal, calentar la composición de célula lisada, y agitar una composición de célula lisada pueden ocurrir en un único recipiente. En algunas realizaciones, las diversas combinaciones de formar una composición de célula, poner en contacto una composición de célula con una base o aumentar el pH de una composición de célula, poner en contacto una composición de célula con una sal, calentar la composición de célula, y agitar una composición de célula pueden ocurrir en un único recipiente. En algunas realizaciones, el único recipiente incluye un recipiente de fermentación. En algunas realizaciones, el recipiente de
- 60

fermentación puede tener un volumen de al menos 20.000 litros, al menos 50.000 litros, al menos 100.000 litros, al menos 120.000 litros, al menos 150.000 litros, al menos 200.000 litros, o al menos 220.000 litros. En algunas realizaciones, el recipiente de fermentación puede tener un volumen de 20.000 litros a 220.000 litros, 20.000 litros a 100.000 litros, 20.000 litros a 50.000 litros, 50.000 litros a 220.000 litros, 50.000 litros a 150.000 litros, 50.000 litros a 100.000 litros, 100.000 litros a 220.000 litros, 100.000 litros a 150.000 litros, 100.000 litros a 120.000 litros, 150.000 litros a 220.000 litros, 150.000 litros a 200.000 litros, o 200.000 litros a 220.000 litros.

En algunas realizaciones, una cantidad de composición de célula o composición de célula lisada formada en un recipiente se puede transferir a uno o más recipientes de agitación. En algunas realizaciones, los recipientes de agitación pueden tener un volumen de al menos 20.000 litros, al menos 30.000 litros, al menos 40.000 litros o al menos 50.000 litros. En algunas realizaciones, the recipientes de agitación pueden tener un volumen de 20.000 litros a 50.000 litros, 20.000 litros a 40.000 litros, 20.000 litros a 30.000 litros, 30.000 litros a 50.000 litros, 30.000 litros a 40.000 litros o 40.000 litros a 50.000 litros.

En algunas realizaciones, los recipientes de agitación pueden tener cualquier combinación de las siguientes propiedades. En algunas realizaciones, los recipientes de agitación pueden tener dos impulsores. En algunas realizaciones, los impulsores son impulsores Rushton de palas. En algunas realizaciones, los impulsores se separan entre sí por una distancia al menos igual a un diámetro del impulsor más pequeño. En algunas realizaciones, los impulsores tienen 30 pulgadas a 40 pulgadas (76,2 a 101,6 cm), 33 pulgadas a 37 pulgadas (83,82 a 93,98 cm), 33 pulgadas (83,82), 34 pulgadas (86,36 cm), 35 pulgadas (88,9 cm), 36 pulgadas (91,44 cm) o 37 pulgadas (93,98 cm) de punta a punta. En algunas realizaciones, los recipientes de agitación tienen un volumen de al menos 10.000 litros, al menos 20.000 litros, al menos 30.000 litros, al menos 40.000 litros o al menos 50.000 litros. En algunas realizaciones, los recipientes de agitación tienen un diámetro interno de 90 pulgadas a 110 pulgadas (228,6 a 279,4 cm), 95 pulgadas a 105 pulgadas (241,3 cm a 266,7 cm), 98 pulgadas (248,92 cm), 99 pulgadas (251,46 cm), 100 pulgadas (254 cm), 101 pulgadas (256,54 cm), o 102 pulgadas (259,08 cm). En algunas realizaciones, un primer impulsor se localiza 15 pulgadas a 20 pulgadas (38,1 a 50,8 cm), 16 pulgadas a 19 pulgadas (40,64 a 48,26 cm), o 17 pulgadas a 18 pulgadas (43,18 a 45,72 cm) desde un fondo del recipiente de agitación y un segundo impulsor se localiza 60 pulgadas a 80 pulgadas (152,4 a 203,2 cm), 65 pulgadas a 75 pulgadas (165,1 a 190,5 cm), 68 pulgadas (172,72 cm), 69 pulgadas (175,26 cm), 70 pulgadas (177,8 cm), 71 pulgadas (180,34 cm), 72 pulgadas (182,88 cm), 73 pulgadas (185,42 cm), 74 pulgadas (187,96 cm), o 75 pulgadas (190,5 cm) por encima del primer impulsor. En algunas realizaciones, una composición de célula lisada se agita a al menos 50 rpm, al menos 60 rpm, o al menos 70 rpm. En algunas realizaciones, una composición de célula lisada se agita a 50 rpm a 70 rpm, 50 rpm a 60 rpm, o 60 rpm a 70 rpm.

En algunas realizaciones, la composición de célula, la composición de célula lisada, o el lípido se recogen de un recipiente por bombeo de la composición de célula, la composición de célula lisada, o el lípido del recipiente. En algunas realizaciones, la composición de célula, la composición de célula lisada, o el lípido se recogen de un recipiente sin agitar el recipiente. En algunas realizaciones, la composición de célula, la composición de célula lisada, o el lípido se recogen de un recipiente por bombeo, sin agitación, de la composición de célula, la composición de célula lisada, o el lípido del recipiente. En algunas realizaciones, la composición de célula, la composición de célula lisada, o el lípido se recogen de un recipiente sin soplar air. En algunas realizaciones, la recogida de la composición de célula, la composición de célula lisada, o el lípido por las técnicas descritas anteriormente da como resultado un lípido en bruto que tiene un bajo valor de anisidina (por ejemplo, 26 o menos, 25 o menos, 20 o menos, 15 o menos, 10 o menos, 5 o menos, 2 o menos, o 1 o menos) y/o un bajo contenido de fósforo (por ejemplo, 100 ppm o menos, 95 ppm o menos, 90 ppm o menos, 85 ppm o menos, 80 ppm o menos, 75 ppm o menos, 70 ppm o menos, 65 ppm o menos, 60 ppm o menos, 55 ppm o menos, 50 ppm o menos, 45 ppm o menos, 40 ppm o menos, 35 ppm o menos, 30 ppm o menos, 25 ppm o menos, 20 ppm o menos, 15 ppm o menos, 10 ppm o menos, 5 ppm o menos, 4 ppm o menos, 3 ppm o menos, 2 ppm o menos, o 1 ppm o menos).

Como se describe en el presente documento, la presente invención utiliza diversas combinaciones de poner en contacto una composición de célula lisada con una primera base o aumentar el pH de una composición de célula lisada, poner en contacto una composición de célula lisada con una sal, calentar una composición de célula lisada, y agitar una composición de célula lisada para proporcionar una composición de célula lisada tratada. Como se describe en el presente documento, la presente invención utiliza diversas combinaciones de poner en contacto una composición de célula con una primera base o aumentar el pH de una composición de célula, poner en contacto una composición de célula con una sal, calentar una composición de célula, y agitar una composición de célula para proporcionar una composición de célula tratada. La composición de célula tratada o la composición de célula lisada tratada es al menos parcialmente desemeulionada en comparación con una composición de célula no tratada o composición de célula lisada tratada. Así, una composición de célula tratada o composición de célula lisada tratada se puede poner en una centrifugadora y un lípido se puede separar de ella.

En algunas realizaciones, después de aumentar el pH de una composición de célula o composición de célula lisada, por ejemplo, poniendo en contacto con una primera base, el calentamiento de la composición de célula o composición de célula lisada y/o la agitación la composición de célula o composición de célula lisada puede disminuir el pH de la composición de célula tratada o composición de célula lisada tratada. Con el fin de que un lípido sea más eficazmente separado de una composición de célula tratada o composición de célula lisada tratada por centrifugar, el pH de la composición de célula tratada o composición de célula lisada tratada se aumenta una

segunda vez, por ejemplo, poniendo en contacto la composición de célula tratada o la composición de célula lisada tratada con una segunda base. En algunas realizaciones, poner en contacto una composición de célula lisada tratada con una segunda base aumenta el pH de la composición de célula tratada o la composición de célula lisada tratada. En algunas realizaciones, una composición de célula tratada o una composición de célula lisada tratada se pone en contacto con una segunda base para aumentar el pH de la composición de célula tratada o la composición de célula lisada tratada hasta 7 o por encima, 7,5 o por encima, 8 o por encima, 8,5 o por encima, 9 o por encima, 9,5 o por encima, 10 o por encima, 10,5 o por encima, 11 o por encima, 11,5 o por encima, o 12 o por encima. En algunas realizaciones, una composición de célula tratada o una composición de célula lisada tratada se pone en contacto con una segunda base para aumentar el pH de la composición de célula lisada tratada hasta 7 a 13, 7 a 12, 7 a 11, 7 a 10, 7 a 9, 7 a 8, 7 a 7,5, 7,5 a 8, 8 a 13, 8 a 12, 8 a 11, 8 a 10, 8 a 9, 8 a 8,5, 8,5 a 9, 9 a 12, 9 a 11, 9 a 10, 9 a 9,5, 9,5 a 10, 10 a 12, o 10 a 11.

En algunas realizaciones, el pH de una composición de célula tratada o una emulsión de célula lisada tratada es 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, o 3 o menos.

Los procesos de la presente invención comprenden separar un lípido de la composición de célula desmenuada.

En algunas realizaciones, la separación comprende centrifugar una composición de célula tratada o una composición de célula lisada tratada (por ejemplo, a una temperatura de 30 °C a 100 °C), por lo que la centrifugación separa un lípido de la composición de célula tratada o la composición de célula lisada tratada.

En algunas realizaciones, un proceso comprende centrifugar una composición de célula tratada o una composición de célula lisada tratada a una temperatura de al menos 10 °C, al menos 20 °C, al menos 25 °C, al menos 30 °C, al menos 35 °C, al menos 40 °C, al menos 45 °C, al menos 50 °C, al menos 55 °C, al menos 60 °C, al menos 65 °C, al menos 70 °C, al menos 75 °C, al menos 80 °C, al menos 85 °C, al menos 90 °C, al menos 95 °C, o al menos 100 °C. En algunas realizaciones, un proceso comprende centrifugar una composición de célula tratada o una composición de célula lisada tratada a una temperatura de 10 °C a 100 °C, 10 °C a 90 °C, 10 °C a 80 °C, 20 °C a 100 °C, 20 °C a 90 °C, 20 °C a 80 °C, 25 °C a 100 °C, 25 °C a 90 °C, 25 °C a 80 °C, 25 °C a 75 °C, 30 °C a 100 °C, 30 °C a 90 °C, 30 °C a 80 °C, 40 °C a 100 °C, 40 °C a 90 °C, 40 °C a 80 °C, 50 °C a 100 °C, 50 °C a 90 °C, 50 °C a 80 °C, 50 °C a 70 °C, 60 °C a 100 °C, 60 °C a 90 °C, 60 °C a 80 °C, 60 °C a 70 °C, 70 °C a 100 °C, o 70 °C a 90 °C.

En algunas realizaciones, la centrifugación se realiza a una velocidad de alimentación (de una composición de célula tratada o una composición de célula lisada tratada en una centrífuga) de 1 kilogramo por minuto (kg/min) a 500 kg/min, 1 kg/min a 400 kg/min, 1 kg/min a 300 kg/min, 1 kg/min a 200 kg/min, 1 kg/min a 100 kg/min, 1 kg/min a 75 kg/min, 1 kg/min a 50 kg/min, 1 kg/min a 40 kg/min, 1 kg/min a 30 kg/min, 1 kg/min a 25 kg/min, 1 kg/min a 10 kg/min, 10 kg/min a 500 kg/min, 10 kg/min a 400 kg/min, 10 kg/min a 300 kg/min, 10 kg/min a 200 kg/min, 10 kg/min a 100 kg/min, 10 kg/min a 75 kg/min, 10 kg/min a 50 kg/min, 10 kg/min a 40 kg/min, 10 kg/min a 30 kg/min, 10 kg/min a 20 kg/min, 20 kg/min a 500 kg/min, 20 kg/min a 400 kg/min, 20 kg/min a 300 kg/min, 20 kg/min a 200 kg/min, 20 kg/min a 100 kg/min, 20 kg/min a 75 kg/min, 20 kg/min a 50 kg/min, 20 kg/min a 40 kg/min, 25 kg/min a 500 kg/min, 25 kg/min a 400 kg/min, 25 kg/min a 300 kg/min, 25 kg/min a 200 kg/min, 25 kg/min a 100 kg/min, 25 kg/min a 75 kg/min, 25 kg/min a 50 kg/min, 30 kg/min a 60 kg/min, 30 kg/min a 50 kg/min, 30 kg/min a 40 kg/min, 50 kg/min a 500 kg/min, 100 kg/min a 500 kg/min, o 200 kg/min a 500 kg/min.

El tiempo total requerido para la separación puede variar dependiendo del volumen de la composición de célula tratada o la composición de célula lisada tratada. El tiempo total típico para la separación (por ejemplo, tiempo de centrífuga) es al menos 0,1 horas, al menos 0,2 horas, al menos 0,5 horas, al menos 1 hora, al menos 2 horas, al menos 4 horas, al menos 6 horas, al menos 8 horas, al menos 10 horas, al menos 12 horas, o 0,1 horas a 24 horas, 0,5 horas a 24 horas, 1 hora a 12 horas, 2 horas a 10 horas, o 4 horas a 8 horas.

En algunas realizaciones, un proceso de la invención comprende centrifugar una composición de célula tratada o una composición de célula lisada tratada a una fuerza centrífuga de 1.000 g a 25.000 g, 1.000 g a 20.000 g, 1.000 g a 10.000 g, 2.000 g a 25.000 g, 2.000 g a 20.000 g, 2.000 g a 15.000 g, 3.000 g a 25.000 g, 3.000 g a 20.000 g, 5.000 g a 25.000 g, 5.000 g a 20.000 g, 5.000 g a 15.000 g, 5.000 g a 10.000 g, 5.000 g a 8.000 g, 10.000 g a 25.000 g, 15.000 g a 25.000 g, o al menos 1.000 g, al menos 2.000 g, al menos 4.000 g, al menos 5.000 g, al menos 7.000 g, al menos 8.000 g, al menos 10.000 g, al menos 15.000 g, al menos 20.000 g, o al menos 25.000 g. Como se usa en el presente documento, "g" se refiere a la gravedad estándar o aproximadamente 9,8 m/s². En algunas realizaciones, un proceso de la invención comprende centrifugar una composición de célula tratada o una composición de célula lisada tratada a 4.000 rpm a 14.000 rpm, 4.000 rpm a 10.000 rpm, 6.000 rpm a 14.000 rpm, 6.000 rpm a 12.000 rpm, 8.000 a 14.000 rpm, 8.000 rpm a 12.000 rpm, o 8.000 rpm a 10.000 rpm.

En algunas realizaciones, un proceso de la invención comprende secar un lípido después de separación del lípido de una composición de célula tratada o una composición de célula lisada tratada para retirar agua del lípido. En algunas realizaciones, secar el lípido puede incluir, pero no se limita a, calentar el lípido para evaporar el agua. En algunas realizaciones, después del secado, el lípido tiene un contenido de agua en porcentaje en peso de lípido que es inferior a 3 %, inferior a 2,5 %, inferior a 2 %, inferior a 1,5 %, inferior a 1 %, inferior a 0,5 %, inferior a 0,1 %, o 0 %. En algunas realizaciones, después del secado, el lípido tiene un contenido de agua en porcentaje en peso de lípido de 0 % a 3 %, 0 % a 2,5 %, 0 % a 2 %, 0 % a 1,5 %, 0 % a 1 %, 0 % a 0,5 %, 0,1 % a 3 %, 0,1 % a 2,5 %, 0,1 % a

2 %, 0,1 % a 1,5 %, 0,1 % a 1 %, 0,1 % a 0,5 %, 0,5 % a 3 %, 0,5 % a 2,5 %, 0,5 % a 2 %, 0,5 % a 1,5 %, 0,5 % a 1 %, 1 % a 3 %, 1 % a 2,5 %, 1 % a 2 %, 1 % a 1,5 %, 1,5 % a 3 %, 1,5 % a 2,5 %, 1,5 % a 2 %, 2 % a 3 %, 2 % a 2,5 %, o 2,5 % a 3 %.

5 En algunas realizaciones, un proceso comprende además refinar un lípido por uno o más procesos seleccionados de refinado cáustico, desengomado, refinado alcalino, blanqueamiento, desodorización, desacidificación, o similares, y combinaciones de los mismos para retirar uno o más fosfolípidos, ácidos grasos libres, fosfatidas, cuerpos de color, esteroides, olores, y otras impurezas. Como se usa en el presente documento, un "aceite refinado" es un lípido en bruto o aceite en bruto que se ha refinado. Como se usa en el presente documento, "un lípido en bruto" o "un aceite en bruto" es un lípido o aceite que no se ha refinado. En algunas realizaciones, el lípido separado de una
10 composición de célula desemulsionada es un lípido en bruto.

Diversos procesos a modo de ejemplo de la presente invención se describen esquemáticamente en las FIGs. 1-2. Con referencia a la FIG. 1, en algunas realizaciones, la presente invención se refiere a un proceso (100) para obtener un lípido (110) de una célula (101), que comprende lisar (102) la célula (101) para formar una composición de célula lisada (103). La composición de célula lisada se pone en contacto con una primera base (104) para
15 desemulsionar la composición de célula lisada (103), se pone en contacto con una sal (105) para desemulsionar la composición de célula lisada (103), y se calienta (106), por ejemplo, durante 10 minutos a 96 horas, para proporcionar una composición de célula lisada tratada (107). La composición de célula lisada tratada (107) se pone en contacto con una segunda base (108) y se separada (109), por ejemplo, a una temperatura de 10 °C a 100 °C, para proporcionar un lípido (110).

20 Con referencia a la FIG. 2, en algunas realizaciones, la presente invención se refiere a un proceso (200) para obtener un lípido (210) de una célula, comprendiendo el proceso lisar (102) una célula (101) para formar una composición de célula lisada (103). La composición de célula lisada se pone entonces en contacto con una base (204) para desemulsionar la composición de célula lisada (103) y para proporcionar una composición de célula lisada tratada (207). La composición de célula lisada tratada (207) se separa (209), por ejemplo, a una temperatura de
25 10 °C a 100 °C, para proporcionar un lípido (210).

Con referencia a la FIG. 3, en algunas realizaciones, la presente divulgación se refiere a un proceso (300) para obtener un lípido (310) de una célula, comprendiendo el proceso lisar (102) una célula (101) para formar una composición de célula lisada (103). La composición de célula lisada se pone entonces en contacto con una sal (305) para desemulsionar la composición de célula lisada (103) y para proporcionar una composición de célula lisada
30 tratada (307), que se separa (309), por ejemplo, a una temperatura de 10 °C a 100 °C, para proporcionar un lípido (310).

Con referencia a la FIG. 4, en algunas realizaciones, la presente divulgación se refiere a un proceso (400) para obtener un lípido (410) de una célula, comprendiendo el proceso lisar (102) una célula (101) para formar una composición de célula lisada (103). La composición de célula lisada se pone entonces en contacto con una sal (405)
35 para desemulsionar la composición de célula lisada (103) y se agita (401), por ejemplo, durante 5 minutos a 96 horas, y opcionalmente se calienta (402), para proporcionar una composición de célula lisada tratada (407). La composición de célula lisada tratada se separa (409) entonces, por ejemplo, a una temperatura de 10 °C a 100 °C, para proporcionar un lípido (410).

40 En algunas realizaciones, un proceso de la presente invención comprende concentrar un caldo que comprende una célula microbiana, un caldo que comprende material vegetal y/o concentrar una composición de célula lisada. Como se usa en el presente documento, "concentrar" se refiere a retirar el agua de una composición. Concentrar puede incluir, pero no se limita a, evaporar, secado químico, centrifugar, y similares, y combinaciones de los mismos.

45 En algunas realizaciones, un caldo que comprende una célula microbiana o un caldo que comprende material vegetal se concentra para proporcionar una concentración de lípido de al menos 4 %, al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, o al menos 30 % en peso de the caldo. En algunas realizaciones, un caldo que comprende una célula microbiana o un caldo que comprende material vegetal se concentra para proporcionar una concentración de lípido de 4 % a 40 %, 4 % a 30 %, 4 % a 20 %, 4 % a 15 %, 5 % a 40 %, 5 % a 30 %, 5 % a 20 %, 10 % a 40 %, 10 % a 30 %, 10 % a 20 %, 15 % a 40 %, 15 % a 30 %, 20 % a 40 %, 20 % a 30 %, 25 % a 40 %, o 30 % a 40 % en peso del caldo.

50 En algunas realizaciones, una composición de célula o una composición de célula lisada se concentra para proporcionar una concentración de lípido de al menos 4 %, al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, o al menos 30 % en peso de la composición de célula lisada. En algunas realizaciones, una composición de célula o una composición de célula lisada se concentra para proporcionar una concentración de lípido de 4 % a 40 %, 4 % a 30 %, 4 % a 20 %, 4 % a 15 %, 5 % a 40 %, 5 % a 30 %, 5 % a 20 %, 10 % a 40 %, 10 % a 30 %, 10 % a 20 %, 15 % a 40 %, 15 % a 30 %, 20 % a 40 %, 20 % a 30 %, 25 % a 40 %, o 30 % a 40 % en
55 peso de la composición de célula lisada.

En algunas realizaciones, un lípido preparado por un proceso de la presente invención tiene una intensidad de aroma global de 2 o menos. Como se usa en el presente documento, el término "intensidad de aroma global" se

refiere a la clasificación sensorial olfativa dada al lípido por un panel de analistas sensoriales. Como se usa en el presente documento, el término "analista sensorial" se refiere a un individuo cualificado que proporciona retroalimentación sobre y/o clasifica las características sensoriales de una sustancia.

5 En algunas realizaciones, un lípido preparado por un proceso de la presente invención tiene una intensidad aromática global de 3 o menos. Como se usa en el presente documento, el término "intensidad aromática global" se refiere a la clasificación gustativa, o de sabor, sensorial, dada al lípido por un panel de analistas sensoriales. En algunas realizaciones, se usa el método de análisis descriptivo de espectro universal para evaluar el aroma y las características aromáticas de muestras. Este método usa una escala de intensidad de 0 - 15, donde 0 = nada detectado y 15 = intensidad muy alta, para medir el aroma y los atributos aromáticos de los aceites.

10 En algunas realizaciones, un lípido preparado por un proceso de la presente invención no tiene un regusto caracterizado como a pescado. Como se usa en el presente documento, el término "regusto" se refiere a la persistencia de una sensación de un aroma en el lípido, como se caracteriza por un panel de analistas sensoriales.

15 En algunas realizaciones, un proceso de la presente invención proporciona un lípido en bruto que tiene un valor de peróxido (VP) de 5 o menos, 4,5 o menos, 4 o menos, 3,5 o menos, 3 o menos, 2,5 o menos, 2 o menos, 1,5 o menos, 1 o menos, 0,5 o menos, 0,2 o menos, o 0,1 o menos. Como se usa en el presente documento, los términos "valor de peróxido" o "VP" se refieren a la medida de productos primarios de reacción, tales como peróxidos e hidroperóxidos, que ocurren durante la oxidación del lípido. En algunas realizaciones, el VP es un indicador de la calidad del lípido y el grado de oxidación que ha ocurrido en el lípido que tiene un bajo VP (es decir, 5 o menos) demuestra aumentada estabilidad y perfiles sensorial que los lípidos que tienen un VP superior a 5. En algunas realizaciones, añadir una base a una composición de célula lisada, como se trata anteriormente, aumenta el pH de la composición de célula lisada e inhibe la oxidación de lípidos, minimizando así la cantidad de radicales libres en la composición de célula lisada de manera que el lípido en bruto obtenido de los procesos de la invención tenga un bajo VP (es decir, 5 o menos).

25 En algunas realizaciones, un proceso de la presente invención proporciona un lípido en bruto que tiene un valor de anisidina (VA) de 26 o menos, 25 o menos, 20 o menos, 15 o menos, 10 o menos, 5 o menos, 2 o menos, o 1 o menos. Como se usa en el presente documento, los términos "valor de anisidina" o "VA" se refieren a la medida de productos secundarios de reacción, tales como aldehídos y cetonas, que ocurren durante la oxidación del lípido. En algunas realizaciones, el VA es un indicador de la calidad del lípido y el grado de oxidación que ha ocurrido en el lípido. Un lípido que tiene un bajo VA (es decir, 26 o menos) demuestra aumentada estabilidad y perfiles sensoriales que los lípidos que tienen un VA superior a 26. En algunas realizaciones, añadir una base a una composición de célula lisada, como se trata anteriormente, aumenta el pH de la composición de célula lisada e inhibe la oxidación de lípidos, minimizando así la cantidad de radicales libres en la composición de célula lisada de manera que el lípido en bruto obtenido de los procesos de la invención tenga un bajo VA (es decir, 26 o menos).

35 En algunas realizaciones, un proceso de la presente invención proporciona un lípido en bruto que tiene un contenido de fósforo de 100 ppm o menos, 95 ppm o menos, 90 ppm o menos, 85 ppm o menos, 80 ppm o menos, 75 ppm o menos, 70 ppm o menos, 65 ppm o menos, 60 ppm o menos, 55 ppm o menos, 50 ppm o menos, 45 ppm o menos, 40 ppm o menos, 35 ppm o menos, 30 ppm o menos, 25 ppm o menos, 20 ppm o menos, 15 ppm o menos, 10 ppm o menos, 5 ppm o menos, 4 ppm o menos, 3 ppm o menos, 2 ppm o menos, o 1 ppm o menos.

40 En algunas realizaciones, un proceso de la presente invención proporciona un lípido en bruto que tiene un valor de anisidina más bajo, valor de peróxido más bajo, contenido de fósforo más bajo y/o un mayor rendimiento de extracción que si la extracción se realizara usando un disolvente (por ejemplo, una extracción típica con hexano o un proceso FRIOLEX® (Westfalia Separator AG, Alemania)). El proceso FRIOLEX® que es un proceso de extracción de lípidos con un disolvente orgánico soluble en agua como se describe en la patente de EE.UU. Nº 5.928.696 y las publicaciones internacionales WO 01/76385 y WO 01/76715.

45 En algunas realizaciones, calentar la composición de célula lisada provoca que los productos secundarios de reacción (por ejemplo, aldehídos y cetonas) participen en una reacción similar a la reacción de Maillard con proteínas presentes en la composición de célula lisada. Se cree que la reacción crea productos que poseen actividad antioxidante, que reducen la oxidación del lípido. En algunas realizaciones, se puede añadir la proteína adicional, por ejemplo, proteína de soja, a la composición de célula lisada para incrementar la actividad antioxidante. La reducción en la oxidación del lípido reduce el VA del lípido, reduce cualquier regusto del lípido y/o incrementa la estabilidad del lípido. En algunas realizaciones, la estabilidad se incrementa al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 % o al menos 20 %.

55 En algunas realizaciones, se puede usar directamente un lípido extraído por un proceso de la presente invención, la biomasa que queda después de la extracción del lípido, o combinaciones de los mismos, como un alimento o ingrediente alimentario, tal como un componente en alimentos infantiles, leche maternizada, bebidas, salsas, alimentos basados en lácteos (tales como leche, yogurt, queso y helado), aceites (por ejemplo, aceites para cocinar o vinagretas), y productos de panadería y pastelería; suplementos nutricionales (por ejemplo, en formas de cápsula o comprimido); pienso o suplementos para piensos para cualquier animal no humano (por ejemplo, aquellos cuyos productos (por ejemplo, carne, leche, o huevos) son consumidos por seres humanos); suplementos alimenticios; y

5 productos farmacéuticos (en aplicación de terapia directa o auxiliar). El término "animal" se refiere a cualquier organismo que pertenezca al reino *Animalia* e incluye cualquier animal humano, y animal no humano de los que derivan productos (por ejemplo, leche, huevos, carne de aves de corral, vaca, cerdo o cordero). En algunas realizaciones, el lípido y/o la biomasa se pueden usar en marisco. El marisco deriva de, sin limitación, peces, gambas y moluscos. El término "productos" incluye cualquier producto derivado de dichos animales, que incluyen, sin limitación, carne, huevos, leche u otros productos. Cuando el lípido y/o la biomasa se alimentan a dichos animales, se pueden incorporar lípidos poliinsaturados en la carne, leche, huevos u otros productos de dichos animales para incrementar el contenido de estos lípidos.

Lípidos microbianos

10 En algunas realizaciones, la presente divulgación se refiere a un lípido microbiano extraído según los procesos de la presente divulgación. En algunas realizaciones, un lípido microbiano en bruto tiene un valor de anisidina de 26 o menos, 25 o menos, 20 o menos, 15 o menos, 10 o menos, 5 o menos, 2 o menos, o 1 o menos, y/o un valor de peróxido de 5 o menos, 4,5 o menos, 4 o menos, 3,5 o menos, 3 o menos, 2,5 o menos, 2 o menos, 1,5 o menos, 1 o menos, 0,5 o menos, 0,2 o menos, o 0,1 o menos, y/o un contenido de fósforo de 100 ppm o menos, 95 ppm o menos, 90 ppm o menos, 85 ppm o menos, 80 ppm o menos, 75 ppm o menos, 70 ppm o menos, 65 ppm o menos, 60 ppm o menos, 55 ppm o menos, 50 ppm o menos, 45 ppm o menos, 40 ppm o menos, 35 ppm o menos, 30 ppm o menos, 25 ppm o menos, 20 ppm o menos, 15 ppm o menos, 10 ppm o menos, 5 ppm o menos, 4 ppm o menos, 3 ppm o menos, 2 ppm o menos, o 1 ppm o menos. En algunas realizaciones, el lípido microbiano en bruto tiene inferior a 5 %, inferior a 4 %, inferior a 3 %, inferior a 2 %, o inferior a 1 % en peso o volumen de un disolvente orgánico. En algunas realizaciones, el lípido microbiano en bruto tiene al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, o al menos 50 % en peso de un PUFA deseado. En algunas realizaciones, el lípido microbiano en bruto tiene al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, o al menos 50 % en peso de DHA, y/o al menos 10 %, al menos 15 %, o al menos 20 % en peso de DPA n-6, y/o al menos 10 %, al menos 15 %, o al menos 20 % en peso de EPA, y/o al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, o al menos 50 % en peso de ARA. En algunas realizaciones, un lípido microbiano en bruto extraído según los procesos de la presente invención da como resultado un menor valor de anisidina, menor valor de peróxido, menor contenido de fósforo y/o un mayor rendimiento de extracción que si la extracción se realizó usando un disolvente (por ejemplo, una extracción típica con hexano o un proceso FRIOLEX® (Westfalia Separator AG, Alemania)).

Lípidos extraídos de un primer conjunto de microorganismos traustoquitridios aislados

35 En algunas realizaciones, la presente divulgación se refiere además a un lípido microbiano extraído de un traustoquitridio como se describe en la publicación de EE. UU. N° 2010/0239533 y la publicación internacional N° WO 2010/107415. En algunas realizaciones, el método comprende cultivar un traustoquitridio en un cultivo para producir una biomasa y extraer un lípido que comprende ácidos grasos omega-3 de la biomasa. El lípido se puede extraer de una biomasa recién recogida o se puede extraer de una biomasa previamente recogida que se ha almacenado en condiciones que previenen el deterioro. Se pueden usar métodos conocidos para cultivar un traustoquitridio de la divulgación, para aislar una biomasa del cultivo, y para analizar el perfil de ácidos grasos de aceites extraídos de la biomasa. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. N° 5.130.242, incorporada como referencia en el presente documento en su totalidad. El lípido se puede extraer según los procesos de la presente invención.

45 Un lípido microbiano de la divulgación puede ser cualquier lípido derivado de un microorganismo que incluye, por ejemplo: un aceite en bruto extraído de la biomasa del microorganismo sin procesamiento adicional; un aceite refinado que se obtiene tratando un aceite microbiano en bruto con etapas adicionales de procesamiento tales como refinado, blanqueamiento, y/o desodorización; un aceite microbiano diluido obtenido diluyendo un aceite microbiano en bruto o refinado; o un aceite enriquecido que se obtiene, por ejemplo, tratando un aceite microbiano en bruto o refinado con métodos adicionales de purificación para incrementar la concentración de un ácido graso (tal como DHA) en el aceite.

50 En algunas realizaciones, el lípido microbiano comprende una fracción de ésteres de esteroles de 0 %, al menos 0,1 %, al menos 0,2 %, al menos 0,5 %, al menos aproximadamente el 1 %, al menos 1,5 %, al menos 2 %, o al menos 5 % en peso. En algunas realizaciones, el lípido microbiano comprende una fracción de ésteres de esteroles de desde 0 % hasta 1,5 %, 0 % hasta 2 %, 0 % hasta 5 %, 1 % hasta 1,5 %, 0,2 % hasta 1,5 %, 0,2 % hasta 2 %, o 0,2 % hasta 5 % en peso. En algunas realizaciones, el lípido microbiano comprende una fracción de ésteres de esteroles inferior a 5 %, inferior a 4 %, inferior a 3 %, o inferior a 2 % en peso.

55 En algunas realizaciones, el lípido microbiano comprende una fracción de triglicéridos de al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, o al menos 90 % en peso. En algunas realizaciones, el lípido microbiano comprende una fracción de triglicéridos de desde 65 % hasta 95 %, 75 % hasta 95 %, o 80 % hasta 95 % en peso, o 97 % en peso, o 98 % en peso.

5 En algunas realizaciones, el lípido microbiano comprende una fracción de ácidos grasos libres de al menos 0,5 %, al menos 1 %, al menos 1,5 %, al menos 2 %, al menos 2,5 %, o al menos 5 % en peso. En algunas realizaciones, el lípido microbiano comprende una fracción de ácidos grasos libres de desde 0,5 % hasta 5 %, 0,5 % hasta 2,5 %, 0,5 % hasta 2 %, 0,5 % hasta 1,5 %, 0,5 % hasta 1 %, 1 % hasta 2,5 %, 1 % hasta 5 %, 1,5 % hasta 2,5 %, 2 % hasta 2,5 %, o 2 % hasta 5 % en peso. En algunas realizaciones, el lípido microbiano comprende una fracción de ácidos grasos libres inferior a 5 %, inferior a 4 %, inferior a 3 %, inferior a 2 %, o inferior a 1 % en peso.

10 En algunas realizaciones, el lípido microbiano comprende una fracción de esteroides de al menos 0,5 %, al menos 1 %, al menos 1,5 %, al menos 2 %, o al menos 5 % en peso. En algunas realizaciones, el lípido microbiano comprende una fracción de esteroides de desde 0,5 % hasta 1,5 %, 1 % hasta 1,5 %, 0,5 % hasta 2 %, 0,5 % hasta 5 %, 1 % hasta 2 %, o 1 % hasta 5 % en peso. En algunas realizaciones, el lípido microbiano comprende una fracción de esteroides inferior a 5 %, inferior a 4 %, inferior a 3 %, inferior a 2 %, o inferior a 1 % en peso.

15 En algunas realizaciones, el lípido microbiano comprende una fracción de diglicéridos de al menos 1,5 %, al menos 2 %, al menos 2,5 %, al menos 3 %, al menos 3,5 %, o al menos 5 % en peso. En algunas realizaciones, el lípido microbiano comprende una fracción de diglicéridos de desde 1,5 % hasta 3 %, 2 % hasta 3 %, 1,5 % hasta 3,5 %, 1,5 % hasta 5 %, 2,5 % hasta 3 %, 2,5 % hasta 3,5 %, o 2,5 % hasta 5 % en peso.

En algunas realizaciones, el lípido microbiano comprende insaponificables de menos de 2 %, menos de 1,5 %, menos de 1 %, o menos de 0,5 % en peso de aceite.

20 Las clases de lípidos presentes en el aceite microbiano, tales como la fracción de triglicéridos, se pueden separar por cromatografía ultrarrápida y se analiza por cromatografía en capa fina (CCF), o se separan y analizan por otros métodos conocidos en la técnica.

25 En algunas realizaciones, el lípido 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 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, o al menos 80 % en peso de DHA. En algunas realizaciones, el lípido 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 40 % hasta 45 %, 40 % hasta 50 %, 40 % hasta 60 %, 50 % hasta 60 %, 55 % hasta 60 %, 40 % hasta 65 %, 50 % hasta 65 %, 55 % hasta 65 %, 40 % hasta 70 %, 40 % hasta 80 %, 50 % hasta 80 %, 55 % hasta 80 %, 60 % hasta 80 %, o 70 % hasta 80 % en peso de DHA. En algunas realizaciones, el lípido microbiano comprende una fracción de ésteres de esteroles que comprende 45 % o menos, 40 % o menos, 35 % o menos, 30 % o menos, 25 % o menos, 20 % o menos, 15 % o menos, o 13 % o menos en peso de DHA. En algunas realizaciones, el lípido 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 10 % o menos, 9 % o menos, 8 % o menos, 7 % o menos, 6 % o menos, 5 % o menos, 4 % o menos, 3 % o menos, 2 % o menos, o 1 % o menos en peso de EPA. En algunas realizaciones, el lípido 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 2 % hasta 3 %, 2 % hasta 3,5 %, 2,5 % hasta 3,5 %, 2 % hasta 6 %, 2,5 % hasta 6 %, 3,0 % hasta 6 %, 3,5 % hasta 6 %, 5 % hasta 6 %, o 2 % hasta 10 % en peso de EPA. En algunas realizaciones, el lípido 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 libre de EPA. En algunas realizaciones, el lípido 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, comprende una relación ponderal entre DHA y EPA de al menos 5:1, al menos 7:1, al menos 9:1, al menos 10:1, al menos 15:1, al menos 20:1, al menos 25:1, al menos 30:1, o al menos 50:1, en donde el lípido microbiano y/o una o más fracciones del mismo comprende 10 % o menos en peso de EPA. En algunas realizaciones, el lípido 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, comprende desde 0,1 % hasta 0,25 %, 0,2 % hasta 0,25 %, 0,1 % hasta 0,5 %, o 0,1 % hasta 1,5 % en peso de ARA. En algunas realizaciones, el lípido 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, comprende 1,5 % o menos, 1 % o menos, 0,5 % o menos, 0,2 % o menos, o 0,1 % o menos en peso de ARA. En algunas realizaciones, el lípido 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 libre de ARA. En algunas realizaciones, el lípido 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 diglicéridos, la fracción polar (incluyendo la fracción de fosfolípidos), y combinaciones de las mismas, comprende una relación ponderal entre DHA y ARA de al menos 20:1, al menos 30:1, al menos 35:1, al menos 40:1, al menos 60:1, al menos 80:1, al menos 100:1, al menos 150:1, al menos 200:1, al menos 250:1, o al menos 300:1. En algunas realizaciones, el lípido 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, comprende desde 0,5 % hasta 1 %, 0,5 % hasta 2 %, 0,5 % hasta 2,5 %, 0,5 % hasta 3 %, 0,5 % hasta 3,5 %, 0,5 % hasta 5 %, 0,5 % hasta 6 %, 1 % hasta 2 %, 2 % hasta 3 %, 2 % hasta 3,5 %, 1 % hasta 2,5 %, 1 % hasta 3 %, 1 % hasta 3,5 %, 1 % hasta 5 %, o 1 % hasta 6 % en peso de DPA n-6. En algunas realizaciones, el lípido 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, comprende 6 % o menos, 5 % o menos, 3 % o menos, 2,5 % o menos, 2 % o menos, 1 % o menos, o 0,5 % o menos en peso de DPA n-6. En algunas realizaciones, el lípido 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 libre de DPA n-6. En algunas realizaciones, el lípido 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, comprende una relación ponderal entre DHA y DPA n-6 superior a 6:1, de al menos 8:1, al menos 10:1, al menos 15:1, al menos 20:1, al menos 25:1, al menos 50:1, o al menos 100:1. En algunas realizaciones, el lípido 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, comprende 5 % o menos, 4 % o menos, 3 % o menos, 2 % o menos, 1,5 % o menos, 1 % o menos, o 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 lípido 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, comprende 5 % o menos, 4 % o menos, 3 % o menos, 2 % o menos, 1,5 % o menos, o 1 % o menos en peso de ácido heptadecanoico (17:0). En algunas realizaciones, el lípido microbiano y/o una o más fracciones de los mismos comprenden 0,01 % a 5 % en peso, 0,05 % a 3 % en peso, o 0,1 % a 1 % en peso de ácido heptadecanoico.

En algunas realizaciones, un lípido microbiano extraído comprende una fracción de triglicéridos de al menos 70 % en peso, en donde el contenido de ácido docosahexaenoico de la fracción de triglicéridos es al menos 50 % en peso, en donde el contenido de ácido docosapentaenoico n-6 de la fracción de triglicéridos es desde al menos 0,5 % en peso hasta 6 % en peso, y en donde el aceite tiene un valor de anisidina de 26 o menos. En algunas realizaciones, un lípido microbiano extraído comprende una fracción de triglicéridos de al menos 70 % en peso, en donde el contenido de ácido docosahexaenoico de la fracción de triglicéridos es al menos 40 % en peso, en donde el contenido de ácido docosapentaenoico n-6 de la fracción de triglicéridos es desde al menos 0,5 % en peso hasta 6 % en peso, en donde la relación entre ácido docosahexaenoico y ácido docosapentaenoico n-6 es mayor que 6:1, y en donde el lípido tiene un valor de anisidina de 26 o menos. En algunas realizaciones, un lípido microbiano extraído comprende una fracción de triglicéridos de al menos 70 % en peso, en donde el contenido de ácido docosahexaenoico de la fracción de triglicéridos es al menos 60 % en peso y en donde el lípido tiene un valor de anisidina de 26 o menos. En algunas realizaciones, un lípido microbiano extraído que tiene cualquiera de los perfiles de ácidos grasos anteriores tiene un valor de anisidina de 26 o menos, 25 o menos, 20 o menos, 15 o menos, 10 o menos, 5 o menos, 2 o menos, o 1 o menos y/o un valor de peróxido de 5 o menos, 4,5 o menos, 4 o menos, 3,5 o menos, 3 o menos, 2,5 o menos, 2 o menos, 1,5 o menos, 1 o menos, 0,5 o menos, 0,2 o menos, o 0,1 o menos, y/o un contenido de fósforo de 100 ppm o menos, 95 ppm o menos, 90 ppm o menos, 85 ppm o menos, 80 ppm o menos, 75 ppm o menos, 70 ppm o menos, 65 ppm o menos, 60 ppm o menos, 55 ppm o menos, 50 ppm o menos, 45 ppm o menos, 40 ppm o menos, 35 ppm o menos, 30 ppm o menos, 25 ppm o menos, 20 ppm o menos, 15 ppm o menos, 10 ppm o menos, 5 ppm o menos, 4 ppm o menos, 3 ppm o menos, 2 ppm o menos, o 1 ppm o menos. En algunas realizaciones, un lípido microbiano extraído que tiene cualquiera de los perfiles de ácidos grasos anteriores se extrae de un microorganismo traustoquitridio aislado que tiene las características de las especies de traustoquitridio depositadas con el Acceso ATCC N° PTA-9695, PTA-9696, PTA-9697, o PTA-9698. En algunas realizaciones, un lípido microbiano extraído que tenga cualquiera de los perfiles de ácidos grasos anteriores es un lípido en bruto. En algunas realizaciones, el lípido en bruto tiene menos de 5 % en peso o volumen de un disolvente orgánico. En algunas realizaciones, el lípido microbiano extraído según los procesos de la presente invención da como resultado un valor de anisidina más bajo, valor de peróxido más bajo, contenido de fósforo más bajo y/o un mayor rendimiento de extracción si la extracción se realizó usando un disolvente (por ejemplo, extracción atípica con hexano o un proceso FRIOLEX® (Westfalia Separator AG, Alemania)).

Lípidos extraídos de un segundo conjunto de microorganismos traustoquitridios aislados

En algunas realizaciones, la presente divulgación se refiere además a un lípido microbiano extraído de un traustocitridio como se describe en la solicitud de EE. UU. N° 12/729.013 y el documento de patente PCT/US2010/028175. En algunas realizaciones, el método comprende cultivar un traustocitridio en un cultivo para producir una biomasa y extraer un lípido que comprende ácidos grasos omega-3 de la biomasa. El lípido se puede extraer de una biomasa recién recogida o se puede extraer de una biomasa previamente recogida que se ha almacenado en condiciones que previenen el deterioro. Se pueden usar métodos conocidos para cultivar un traustocitridio de la divulgación, para aislar una biomasa del cultivo, y para analizar el perfil de ácidos grasos de aceites extraídos de la biomasa. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. N° 5.130.242, incorporada como referencia en el presente documento en su totalidad. El lípido se puede extraer según los procesos de la presente invención.

Un lípido microbiano de la divulgación puede ser cualquier lípido derivado de un microorganismo, que incluye, por ejemplo: un aceite en bruto extraído de la biomasa del microorganismo sin procesamiento adicional; un aceite refinado que se obtiene tratando un aceite microbiano en bruto con etapas adicionales de procesamiento tales como refinado, blanqueamiento y/o desodorización; un aceite microbiano diluido obtenido diluyendo un aceite microbiano en bruto o refinado; o un aceite enriquecido que se obtiene, por ejemplo, tratando un aceite microbiano en bruto o refinado con métodos adicionales de purificación para incrementar la concentración de un ácido graso (tal como DHA) en el aceite.

En algunas realizaciones, el lípido microbiano comprende una fracción de ésteres de esteroles de 0 %, al menos 0,1 %, al menos 0,2 %, al menos 0,5 %, al menos 1 %, al menos 1,5 %, al menos 2 %, o al menos 5 % en peso. En algunas realizaciones, el lípido microbiano comprende una fracción de ésteres de esteroles de 0 % a 1,5 %, 0 % a 2 %, 0 % a 5 %, 1 % a 1,5 %, 0,2 % a 1,5 %, 0,2 % a 2 %, o 0,2 % a 5 % en peso. En algunas realizaciones, el lípido microbiano comprende una fracción de ésteres de esteroles de 5 % o menos, 4 % o menos, 3 % o menos, 2 % o menos, 1 % o menos, 0,5 % o menos, 0,3 % o menos, 0,2 % o menos, 0,5 % o menos, 0,4 % o menos, 0,3 % o menos, o 0,2 % o menos en peso.

En algunas realizaciones, el lípido microbiano comprende una fracción de triacilglicerol de al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, o al menos 90 % en peso. En algunas realizaciones, el lípido microbiano comprende una fracción de triacilglicerol de 35 % a 98 %, 35 % a 90 %, 35 % a 80 %, 35 % a 70 %, 35 % a 70 %, 35 % a 65 %, 40 % a 70 %, 40 % a 65 %, 40 % a 55 %, 40 % a 50 %, 65 % a 95 %, 75 % a 95 %, 75 % a 98 %, 80 % a 95 %, 80 % a 98 %, 90 % a 96 %, 90 % a 97 %, 90 % a 98 %, 90 %, 95 %, 97 %, o 98 % en peso.

En algunas realizaciones, el lípido microbiano comprende una fracción de diacilglicerol de al menos 10 %, al menos 11 %, al menos 12 %, al menos 13 %, al menos 14 %, al menos 15 %, al menos 16 %, al menos 17 %, al menos 18 %, al menos 19 %, o al menos 20 % en peso. En algunas realizaciones, el lípido microbiano comprende una fracción de diacilglicerol de 10 % a 45 %, 10 % a 40 %, 10 % a 35 %, 10 % a 30 %, 15 % a 40 %, 15 % a 35 %, o 15 % a 30 % en peso. En algunas realizaciones, el lípido microbiano comprende una fracción de 1,2-diacilglicerol de al menos 0,2 %, al menos 0,3 %, al menos 0,4 %, al menos 0,5 %, al menos 1 %, al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 11 %, al menos 12 %, al menos 13 %, al menos 14 %, al menos 15 %, al menos 16 %, al menos 17 %, al menos 18 %, al menos 19 %, o al menos 20 % en peso. En algunas realizaciones, el lípido microbiano comprende una fracción de diacilglicerol de 0,2 % a 45 %, 0,2 % a 30 %, 0,2 % a 20 %, 0,2 % a 10 %, 0,2 % a 5 %, 0,2 % a 1 %, 0,2 % a 0,8 %, 0,4 % a 45 %, 0,4 % a 30 %, 0,4 % a 20 %, 0,4 % a 10 %, 0,4 % a 5 %, 0,4 % a 1 %, 0,4 % a 0,8 %, 0,5 % a 1 %, 0,5 % a 0,8 %, 10 % a 45 %, 10 % a 40 %, 10 % a 35 %, 10 % a 30 %, 15 % a 40 %, 15 % a 35 %, 15 % a 30 %, o 15 % a 25 % en peso. En algunas realizaciones, el lípido microbiano comprende una fracción de 1,3-diacilglicerol de al menos 0,1 %, al menos 0,2 %, al menos 0,5 %, al menos 1 %, al menos 2 %, al menos 2,5 %, o al menos 3 % en peso.

En algunas realizaciones, el lípido microbiano comprende una fracción de esterol de al menos 0,3 %, al menos 0,4 %, al menos 0,5 %, al menos 1 %, al menos 1,5 %, al menos 2 %, o al menos 5 % en peso. En algunas realizaciones, el lípido microbiano comprende una fracción de esterol de 0,3 % a 5 %, 0,3 % a 2 %, 0,3 % a 1,5 %, 0,5 % a 1,5 %, 1 % a 1,5 %, 0,5 % a 2 %, 0,5 % a 5 %, 1 % a 2 %, o 1 % a 5 % en peso. En algunas realizaciones, el lípido microbiano comprende una fracción de esterol de 5 % o menos, 4 % o menos, 3 % o menos, 2 % o menos, 1,5 % o menos, o 1 % o menos en peso.

En algunas realizaciones, el lípido microbiano comprende una fracción de fosfolípidos de al menos 2 %, al menos 5 %, o al menos 8 % en peso. En algunas realizaciones, el lípido microbiano comprende una fracción de fosfolípidos de 2 % a 25 %, 2 % a 20 %, 2 % a 15 %, 2 % a 10 %, 5 % a 25 %, 5 % a 20 %, 5 % a 20 %, 5 % a 10 %, o 7 % a 9 % en peso. En algunas realizaciones, el lípido microbiano comprende una fracción de fosfolípidos inferior a 20 %, inferior a 15 %, inferior a 10 %, inferior a 9 %, o inferior a 8 % en peso. En algunas realizaciones, el lípido microbiano está sustancialmente libre de fosfolípidos.

En algunas realizaciones, el lípido microbiano comprende insaponificables de menos de 2 %, menos de 1,5 %, menos de 1 %, o menos de 0,5 % en peso de aceite.

Las clases de lípidos presentes en el lípido microbiano, tal como una fracción de triacilgliceroles, se puede separar por cromatografía ultrarrápida y analizar por cromatografía en capa fina (CCF), o separar y analizar por otros métodos conocidos en la técnica.

- 5 En algunas realizaciones, el lípido microbiano y/o una o más fracciones del mismo seleccionadas de la fracción de triacilgliceroles, la fracción de ácidos grasos libres, la fracción de esteroides, la fracción de diacilgliceroles, y combinaciones de las mismas, comprende al menos 5 %, al menos 10 %, superior a 10 %, al menos 12 %, al menos 13 %, al menos 14 %, al menos 15 %, al menos 16 %, al menos 17 %, al menos 18 %, al menos 19 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, o al menos 45 % en peso de EPA. En algunas realizaciones, el lípido microbiano y/o una o más fracciones del mismo seleccionadas de la fracción de triacilgliceroles, la fracción de ácidos grasos libres, la fracción de esteroides, la fracción de diacilgliceroles, y combinaciones de las mismas, comprende 5 % a 55 %, 5 % a 50 %, 5 % a 45 %, 5 % a 40 %, 5 % a 35 %, 5 % a 30 %, 10 % a 55 %, 10 % a 50 %, 10 % a 45 %, 10 % a 40 %, 10 % a 35 %, 10 % a 30 %, al menos 12 % a 55 %, al menos 12 % a 50 %, al menos 12 % a 45 %, al menos 12 % a 40 %, al menos 12 % a 35 %, o al menos 12 % a 30 %, 15 % a 55 %, 15 % a 50 %, 15 % a 45 %, 15 % a 40 %, 15 % a 35 %, 15 % a 30 %, 15 % a 25 %, 15 % a 20 %, 20 % a 55 %, 20 % a 50 %, 20 % a 45 %, 20 % a 40 %, o 20 % a 30 % en peso de EPA. En algunas realizaciones, el lípido microbiano y/o una o más fracciones del mismo seleccionadas de la fracción de triacilgliceroles, la fracción de diacilgliceroles, la fracción de esteroides, la fracción de ésteres de esteroles, la fracción de ácidos grasos libres, la fracción de fosfolípidos, y combinaciones de las mismas, comprende al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 50 %, o al menos 60 % en peso de DHA. En algunas realizaciones, el lípido microbiano y/o una o más fracciones del mismo seleccionadas de la fracción de triacilgliceroles, la fracción de diacilgliceroles, la fracción de esteroides, la fracción de ésteres de esteroles, la fracción de ácidos grasos libres, la fracción de fosfolípidos, y combinaciones de las mismas, comprende 5 % a 60 %, 5 % a 55 %, 5 % a 50 %, 5 % a 40 %, 10 % a 60 %, 10 % a 50 %, 10 % a 40 %, 20 % a 60 %, 25 % a 60 %, 25 % a 50 %, 25 % a 45 %, 30 % a 50 %, 35 % a 50 %, o 30 % a 40 % en peso de DHA.
- 20 En algunas realizaciones, el lípido microbiano y/o una o más fracciones del mismo seleccionadas de la fracción de triacilgliceroles, la fracción de diacilgliceroles, la fracción de esteroides, la fracción de ésteres de esteroles, la fracción de ácidos grasos libres, la fracción de fosfolípidos, y combinaciones de las mismas, comprende 10 % o menos, 9 % o menos, 8 % o menos, 7 % o menos, 6 % o menos, 5 % o menos, 4 % o menos, 3 % o menos, 2 % o menos, o 1 % o menos en peso de DHA. En algunas realizaciones, el lípido microbiano y/o una o más fracciones del mismo seleccionadas de la fracción de triacilgliceroles, la fracción de diacilgliceroles, la fracción de esteroides, la fracción de ésteres de esteroles, la fracción de ácidos grasos libres, la fracción de fosfolípidos, y combinaciones de las mismas, comprende 1 % a 10 %, 1 % a 5 %, 2 % a 5 %, 3 % a 5 %, o 3 % a 10 % en peso de los ácidos grasos como DHA. En algunas realizaciones, el lípido microbiano y/o una o más fracciones del mismo seleccionadas de la fracción de triacilgliceroles, la fracción de diacilgliceroles, la fracción de esteroides, la fracción de ésteres de esteroles, la fracción de ácidos grasos libres, la fracción de fosfolípidos, y combinaciones de las mismas, está sustancialmente libre de DHA.
- 25 En algunas realizaciones, el lípido microbiano y/o una o más fracciones del mismo seleccionadas de la fracción de triacilgliceroles, la fracción de diacilgliceroles, la fracción de esteroides, la fracción de ésteres de esteroles, la fracción de ácidos grasos libres, la fracción de fosfolípidos, y combinaciones de las mismas, comprende 0,1 % a 5 %, 0,1 % a inferior a 5 %, 0,1 % a 4 %, 0,1 % a 3 %, 0,1 % a 2 %, 0,2 % a 5 %, 0,2 % a inferior a 5 %, 0,2 % a 4 %, 0,2 % a 3 %, 0,2 % a 2 %, 0,3 % a 2 %, 0,1 % a 0,5 %, 0,2 % a 0,5 %, 0,1 % a 0,4 %, 0,2 % a 0,4 %, 0,5 % a 2 %, 1 % a 2 %, 0,5 % a 1,5 %, o 1 % a 1,5 % en peso de ARA. En algunas realizaciones, el lípido microbiano y/o una o más fracciones del mismo seleccionadas de la fracción de triacilgliceroles, la fracción de diacilgliceroles, la fracción de esteroides, la fracción de ésteres de esteroles, la fracción de ácidos grasos libres, la fracción de fosfolípidos, y combinaciones de las mismas, comprende 5 % o menos, inferior a 5 %, 4 % o menos, 3 % o menos, 2 % o menos, 1,5 % o menos, 1 % o menos, 0,5 % o menos, 0,4 % o menos, 0,3 % o menos, 0,2 % o menos, o 0,1 % o menos en peso de ARA. En algunas realizaciones, el lípido microbiano y/o una o más fracciones del mismo seleccionadas de la fracción de triacilgliceroles, la fracción de diacilgliceroles, la fracción de esteroides, la fracción de ésteres de esteroles, la fracción de ácidos grasos libres, la fracción de fosfolípidos, y combinaciones de las mismas, está sustancialmente libre de ARA. En algunas realizaciones, el lípido microbiano y/o una o más fracciones del mismo seleccionadas de la fracción de triacilgliceroles, la fracción de diacilgliceroles, la fracción de esteroides, la fracción de ésteres de esteroles, la fracción de ácidos grasos libres, la fracción de fosfolípidos, y combinaciones de las mismas, comprende 0,4 % a 2 %, 0,4 % a 3 %, 0,4 % a 4 %, 0,4 % a 5 %, 0,4 % a inferior a 5 %, 0,5 % a 1 %, 0,5 % a 2 %, 0,5 % a 3 %, 0,5 % a 4 %, 0,5 % a 5 %, 0,5 % a inferior a 5 %, 1 % a 2 %, 1 % a 3 %, 1 % a 4 %, 1 % a 5 %, o 1 % a menos de 5 % en peso de DPA n-6. En algunas realizaciones, el lípido microbiano y/o una o más fracciones del mismo seleccionadas de la fracción de triacilgliceroles, la fracción de diacilgliceroles, la fracción de esteroides, la fracción de ésteres de esteroles, la fracción de ácidos grasos libres, la fracción de fosfolípidos, y combinaciones de las mismas, comprende 5 %, inferior a 5 %, 4 % o menos, 3 % o menos, 2 % o menos, 1 % o menos, 0,75 % o menos, 0,6 % o menos, o 0,5 % o menos en peso de DPA n-6. En algunas realizaciones, el lípido microbiano y/o una o más fracciones del mismo seleccionadas de la fracción de triacilgliceroles, la fracción de diacilgliceroles, la fracción de esteroides, la fracción de ésteres de esteroles, la fracción de ácidos grasos libres, la fracción de fosfolípidos, y combinaciones de las mismas, está sustancialmente libre de DPA n-6. En algunas realizaciones, el lípido microbiano y/o una o más fracciones del mismo seleccionadas de la fracción de triacilgliceroles, la fracción de diacilgliceroles, la fracción de esteroides, la fracción de ésteres de esteroles, la fracción de ácidos grasos libres, la fracción de fosfolípidos, y combinaciones de las mismas, comprende ácidos grasos con 5 % o menos, inferior a 5 %, 4 % o menos, 3 % o menos, o 2 % o menos en peso de ácido oleico (18:1 n-9), ácido linoleico (18:2 n-6), ácido linoléico (18:3 n-3),

ácido eicosenoico (20:1 n-9), ácido erúcico (22:1 n-9), ácido estearidónico (18:4 n-3), o combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, un lípido microbiano extraído comprende al menos 20 % en peso de ácido eicosapentaenoico y menos de 5 % en peso de cada uno de ácido araquidónico, ácido docosapentaenoico n-6, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido eicosenoico, ácido erúcico y ácido estearidónico. En algunas realizaciones, un lípido microbiano extraído comprende una fracción de triacilgliceroles de al menos 10 % en peso, en donde al menos 12 % en peso de los ácidos grasos en la fracción de triacilgliceroles es ácido eicosapentaenoico, en donde al menos 25 % en peso de los ácidos grasos en la fracción de triacilgliceroles es ácido docosahexaenoico, y en donde menos de 5 % en peso de los ácidos grasos en la fracción de triacilgliceroles es ácido araquidónico. En algunas realizaciones, un lípido microbiano extraído que tiene cualquiera de los perfiles de ácidos grasos anteriores tiene un valor de anisidina de 26 o menos, 25 o menos, 20 o menos, 15 o menos, 10 o menos, 5 o menos, 2 o menos, o 1 o menos, y/o un valor de peróxido de 5 o menos, 4,5 o menos, 4 o menos, 3,5 o menos, 3 o menos, 2,5 o menos, 2 o menos, 1,5 o menos, 1 o menos, 0,5 o menos, 0,2 o menos, o 0,1 o menos, y/o un contenido de fósforo de 100 ppm o menos, 95 ppm o menos, 90 ppm o menos, 85 ppm o menos, 80 ppm o menos, 75 ppm o menos, 70 ppm o menos, 65 ppm o menos, 60 ppm o menos, 55 ppm o menos, 50 ppm o menos, 45 ppm o menos, 40 ppm o menos, 35 ppm o menos, 30 ppm o menos, 25 ppm o menos, 20 ppm o menos, 15 ppm o menos, 10 ppm o menos, 5 ppm o menos, 4 ppm o menos, 3 ppm o menos, 2 ppm o menos, o 1 ppm o menos. En algunas realizaciones, un lípido microbiano extraído que tiene cualquiera de los perfiles de ácidos grasos anteriores se extrae de un microorganismo traustquitridio aislado que tiene las características de la especie de traustquitridio depositada con el N° de acceso ATCC PTA-10208, PTA-10209, PTA-10210, PTA-10211, PTA-10212, PTA-10213, PTA-10214, o PTA-10215. En algunas realizaciones, un lípido microbiano extraído que tiene cualquiera de los perfiles de ácidos grasos anteriores es un lípido en bruto. En algunas realizaciones, el lípido en bruto tiene menos de 5 % en peso o volumen de un disolvente orgánico. En algunas realizaciones un lípido microbiano extraído según los procesos de la presente invención da como resultado un valor de anisidina más bajo, y/o valor de peróxido más bajo, y/o contenido de fósforo más bajo que si la extracción se realizó usando una extracción típica con hexano o un proceso FRIOLEX® (Westfalia Separator AG, Alemania).

En algunas realizaciones, un lípido obtenido por cualquiera de los procesos de la presente invención comprende al menos 20 % en peso de ácido eicosapentaenoico y menos de 5 % en peso de cada uno de ácido araquidónico, ácido docosapentaenoico n-6, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido eicosenoico, ácido erúcico y ácido estearidónico. En algunas realizaciones, un lípido obtenido por cualquiera de los procesos de la presente invención comprende una fracción de triacilgliceroles de al menos 10 % en peso, en donde al menos 12 % en peso de los ácidos grasos en la fracción de triacilgliceroles es ácido eicosapentaenoico, en donde al menos 25 % en peso de los ácidos grasos en la fracción de triacilgliceroles es ácido docosahexaenoico, y en donde menos de 5 % en peso de los ácidos grasos en la fracción de triacilgliceroles es ácido araquidónico. En algunas realizaciones, un lípido obtenido por cualquiera de los procesos de la presente invención que tiene cualquiera de los perfiles de ácidos grasos anteriores tiene un valor de anisidina de 26 o menos, 25 o menos, 20 o menos, 15 o menos, 10 o menos, 5 o menos, o 2 o menos, o 1 o menos y/o un valor de peróxido de 5 o menos, 4,5 o menos, 4 o menos, 3,5 o menos, 3 o menos, 2,5 o menos, 2 o menos, 1,5 o menos, 1 o menos, 0,5 o menos, 0,2 o menos, o 0,1 o menos, y/o un contenido de fósforo de 100 ppm o menos, 95 ppm o menos, 90 ppm o menos, 85 ppm o menos, 80 ppm o menos, 75 ppm o menos, 70 ppm o menos, 65 ppm o menos, 60 ppm o menos, 55 ppm o menos, 50 ppm o menos, 45 ppm o menos, 40 ppm o menos, 35 ppm o menos, 30 ppm o menos, 25 ppm o menos, 20 ppm o menos, 15 ppm o menos, 10 ppm o menos, 5 ppm o menos, 4 ppm o menos, 3 ppm o menos, 2 ppm o menos, o 1 ppm o menos. En algunas realizaciones, un lípido obtenido por cualquiera de los procesos de la presente invención que tiene cualquiera de los perfiles de ácidos grasos anteriores se extrae de un microorganismo traustquitridio aislado que tiene las características de la especie de traustquitridio depositada con el N° de acceso ATCC PTA-10208, PTA-10209, PTA-10210, PTA-10211, PTA-10212, PTA-10213, PTA-10214 o PTA-10215. En algunas realizaciones, un lípido obtenido por cualquiera de los procesos de la presente invención que tiene cualquiera de los perfiles de ácidos grasos anteriores es un lípido en bruto. En algunas realizaciones, el lípido en bruto tiene menos de 5 % en peso o volumen de un disolvente orgánico. En algunas realizaciones un lípido extraído según los procesos de la presente invención da como resultado un valor de anisidina más bajo, valor de peróxido más bajo, contenido de fósforo más bajo y/o un mayor rendimiento de extracción si la extracción se realizó usando un disolvente (por ejemplo, una extracción típica con hexano o un proceso FRIOLEX® (Westfalia Separator AG, Alemania)).

Lípidos extraídos de un microorganismo aislado de la especie *Cryptocodinium cohnii*

En algunas realizaciones, la presente divulgación se refiere además a un lípido en bruto extraído de un microorganismo de la especie *Cryptocodinium cohnii*. En algunas realizaciones, el método comprende cultivar un microorganismo de la especie *Cryptocodinium cohnii* en un cultivo para producir una biomasa y extraer un lípido que comprende ácidos grasos omega-3 de la biomasa. El lípido se puede extraer de una biomasa recién recogida o se puede extraer de una biomasa previamente recogida que se ha almacenado en condiciones que previenen el deterioro. Se pueden usar métodos conocidos para cultivar un microorganismo de la especie *Cryptocodinium cohnii*, y para aislar una biomasa del cultivo. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. N° 7.163.811. El lípido se puede extraer según los procesos de la presente invención.

En algunas realizaciones, el lípido en bruto extraído de un microorganismo de la especie *Cryptocodinium cohnii* según los métodos de extracción de la presente invención puede tener un contenido de fósforo más bajo en comparación con el uso de un método típico de extracción con hexano. En algunas realizaciones, el lípido en bruto extraído de un microorganismo de la especie *Cryptocodinium cohnii* comprende un contenido de fósforo de 100 ppm o menos, 95 ppm o menos, 90 ppm o menos, 85 ppm o menos, 80 ppm o menos, 75 ppm o menos, 70 ppm o menos, 65 ppm o menos, 60 ppm o menos, 55 ppm o menos, 50 ppm o menos, 45 ppm o menos, 40 ppm o menos, 35 ppm o menos, 30 ppm o menos, 25 ppm o menos, 20 ppm o menos, 15 ppm o menos, 10 ppm o menos, 5 ppm o menos, 4 ppm o menos, 3 ppm o menos, 2 ppm o menos, o 1 ppm o menos. En algunas realizaciones, el aceite en bruto tiene un valor de anisidina de 26 o menos, 25 o menos, 20 o menos, 15 o menos, 10 o menos, 5 o menos, o 2 o menos, o 1 o menos y/o un valor de peróxido de 5 o menos, 4,5 o menos, 4 o menos, 3,5 o menos, 3 o menos, 2,5 o menos, 2 o menos, 1,5 o menos, 1 o menos, 0,5 o menos, 0,2 o menos, o 0,1 o menos. En algunas realizaciones un lípido microbiano en bruto extraído según los procesos de la presente invención da como resultado un valor de anisidina más bajo, valor de peróxido más bajo, contenido de fósforo más bajo y/o un mayor rendimiento de extracción si la extracción se realizó usando un disolvente (por ejemplo, una extracción típica con hexano o un proceso FRIOLEX® (Westfalia Separator AG, Alemania)).

Habiendo descrito, en general, la invención, se puede obtener un entendimiento adicional como referencia a los ejemplos proporcionados en el presente documento. Estos ejemplos se dan para los fines de ilustración solo y no pretenden ser limitantes. Los siguientes ejemplos son ilustrativos, pero no limitantes, de un proceso y un lípido preparado por un proceso de la presente invención.

20 EJEMPLOS

Ejemplo 1

Se calentó un caldo de células (20.000 kg) que contenía células microbianas (*Schizochytrium*) hasta 60 °C. Se añadieron enzimas (es decir, Alcalasa 2,4 L FG 0,5 %) a la biomasa de células para lisar las células y formar una composición de célula lisada emulsionada. Se trató la composición de célula lisada emulsionada primero con una primera base (NaOH, 250 kg de disolución al 50 % p/p) hasta que el pH de la composición de célula lisada fue desde 10,4 hasta 10,6. A continuación, se añadió una sal (NaCl sólido, en una cantidad de 2 %, en peso, de la composición de célula lisada) a la composición de célula lisada. Entonces se calentó la composición de célula lisada hasta una temperatura de 85 °C a 102 °C y se mantuvo a ese nivel de temperatura durante 24 horas a 70 horas. Entonces se añadió una segunda base (NaOH, disolución al 50 % p/p, 40 kg) a la composición de célula lisada hasta que el pH fue superior a 8. Entonces se centrifugó la composición de célula lisada para separar la composición de célula lisada en tres fases: una fase superior que contenía una capa lipídica, una fase central que contenía una capa de emulsión, y una fase inferior que contenía una capa sólida. Entonces se centrifugó la composición de célula lisada a 40 °C a 80 °C usando una centrífuga Westfalia RSE110 (Westfalia Separator Industry GmbH, Alemania), que operaba a 6.000 rpm a una velocidad de alimentación de 30 kg/min para separar un lípido de la composición de célula lisada. La centrifugación proporcionó tres fases: una fase superior que contenía un lípido, una fase central que contenía una emulsión, y una fase inferior que contenía una emulsión sólido/líquida. El pH de la composición de célula lisada se mantuvo a 7,5 a 8,5 durante la centrifugación. El tiempo total para centrifugar todo el lote de 20.000 kg fue aproximadamente 10 a 11 horas. Se separó la capa lipídica y tuvo un contenido de humedad de aproximadamente 1 % en peso.

40 Ejemplo 2

Se concentró un caldo de células (500 g) que contenía células microbianas (*Cryptocodinium cohnii*) a partir de aproximadamente 7 % de biomasa hasta 13,5 % de biomasa, en peso del caldo. El caldo se homogeneizó a una presión de 10.000 psi (2 pases) para formar una composición de célula lisada. La composición de célula lisada se trató con una base (es decir, NaOH, 10 g de una disolución al 50 % p/p) hasta que el pH de la composición de célula lisada fue 10,4 a 10,6. Se añadió una sal (NaCl sólido, en una cantidad de 2 % en peso de la composición de célula lisada) a la composición de célula lisada. Entonces se calentó la composición de célula lisada hasta una temperatura de 85 °C a 92 °C y se mantuvo en ese intervalo de temperatura durante 15 minutos a 2 horas. Entonces se centrifugó la composición de célula lisada a una temperatura de 70 °C a 90 °C usando una centrifugadora Bench Top Sigma 6K15 (SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Alemania), que operaba a 5.400 rpm para separar la composición de célula lisada en tres fases: una fase superior que contenía un lípido, una fase central que contenía una emulsión, y una fase inferior que contenía una emulsión sólido/líquida. Se mantuvo el pH de la composición de célula lisada durante la centrifugación a 6,5 a 8,5. El tiempo total para la centrifugación fue 5 minutos. Se separó la capa lipídica y tuvo un contenido de humedad de aproximadamente 1 % en peso.

Ejemplo 3

55 Se calentó un caldo de células (20.000 kg) que contenía células microbianas (*Schizochytrium*) hasta 60 °C. Se añadieron enzimas (es decir, Alcalasa 2,4 L FG 0,5 %) a la biomasa de células para lisar las células y formar una composición de célula lisada. A continuación, se añadió una sal (Na₂SO₄ sólido, 2.000 kg, o 10 %, en peso, de la composición de célula lisada) a la composición de célula lisada. Entonces se agitó la composición de célula lisada durante 24 horas a 48 horas a temperatura ambiente. Entonces se centrifugó la composición de célula lisada a 40 °C

a 75 °C usando una centrifuga Westfalia RSE110 (Westfalia Separator Industry GmbH, Alemania), que operaba a 6.000 rpm a una velocidad de alimentación de 40 kg/min para separar un lípido de la composición de célula lisada. La centrifugación proporcionó tres fases: una fase superior que contenía un lípido, una fase central que contenía una emulsión, y una fase inferior que contenía una emulsión sólido/líquida. El tiempo total para centrifugar todo el lote de 20.000 kg fue aproximadamente 8 a 9 horas. Se separó la capa lipídica de la composición de célula lisada centrifugada.

Ejemplo 4

Se proporcionó un caldo de células pasteurizado (500 g) que contenía células microbianas (Nº de acceso ATCC PTA-10208). Se añadieron enzimas (es decir, Alcalasa 2,4 L FG 0,5 %) a la biomasa de células para lisar las células y formar una composición de célula lisada emulsionada. Se trató la composición de célula lisada emulsionada con una primera base (es decir, una disolución al 25 % de NaOH) para ajustar el pH de la composición de célula lisada hasta 10,5. A continuación, se añadió una sal (NaCl sólido, en una cantidad de 2 %, en peso, de la composición de célula lisada) a la composición de célula lisada. Entonces se calentó la composición de célula lisada hasta una temperatura de 95 °C y se mantuvo a ese nivel de temperatura durante 2 horas mientras se agitaba la composición de célula lisada. Entonces se añadió una segunda base (es decir, una disolución al 25 % de NaOH) a la composición de célula lisada hasta que el pH fue 8,3. Entonces se centrifugó la composición de célula lisada a 5.100 rpm durante 5 minutos para separar la composición de célula lisada y dar una capa lipídica y una pequeña capa de emulsión.

Ejemplo 5

Se proporcionó un caldo de células (500 g) que se concentró y pasteurizó que contenía células microbianas (Nº de acceso ATCC PTA-9695). Se añadieron enzimas (es decir, Alcalasa 2,4 L FG 0,5 %) a la biomasa de células para lisar las células y formar una composición de célula lisada emulsionada. Se trató la composición de célula lisada emulsionada con una base (es decir, una disolución al 25 % de NaOH) para ajustar el pH de la composición de célula lisada hasta 10,5. A continuación, se añadió una sal (NaCl sólido, en una cantidad de 2 %, en peso, de la composición de célula lisada) a la composición de célula lisada. Entonces se calentó la composición de célula lisada hasta una temperatura de 95 °C y se mantuvo a ese nivel de temperatura durante 1 hora mientras se agitaba la composición de célula lisada y el pH disminuyó hasta 8,5. Después de una hora en el caldo de fermentación que tenía un total de 10 mL, hubo aproximadamente 1 mL de capa de aceite (lípido) y aproximadamente 6 mL de capa de emulsión. Se calentó la composición de célula lisada durante un total de 220 minutos y empezó a desaparecer la capa de emulsión. Entonces se centrifugó la composición de célula lisada a 5.100 rpm durante 5 minutos para separar la composición de célula lisada. El rendimiento de extracción del lípido fue 58,8 % en peso. El valor de anisidina (VA) del aceite en bruto fue 11,3. El rendimiento de rotura de las células fue en un intervalo de 93 % a 95 % en peso

Ejemplo 6

Se proporcionó un caldo de células pasteurizado (473 g) que contenía células microbianas del traustoquitridio aislado depositado con el Nº de acceso ATCC PTA-9695. Se añadieron enzimas (es decir, Alcalasa 2,4 L FG 0,5 %) a la biomasa de células para lisar las células y formar una composición de célula lisada emulsionada. Se trató la composición de célula lisada emulsionada con una primera base (es decir, una disolución al 25 % de NaOH) para ajustar el pH de la composición de célula lisada hasta 10,62. A continuación, se añadió una sal (NaCl sólido, en una cantidad de 2 %, en peso, de la composición de célula lisada) a la composición de célula lisada. Entonces se calentó la composición de célula lisada hasta una temperatura de 95 °C y se mantuvo a ese nivel de temperatura durante 3 horas mientras se agitaba la composición de célula lisada. Entonces se añadió una segunda base (es decir, una disolución cáustica al 25 % de NaOH) a la composición de célula lisada hasta que el pH fue 8,13. Entonces se centrifugó la composición de célula lisada a 5.100 rpm durante 5 minutos para separar la composición de célula lisada y dar una capa lipídica y una capa de emulsión en cantidades iguales. Para determinar si aumentar el pH incrementó el rendimiento de la capa lipídica, se añadió segunda base adicional (es decir, una disolución al 25 % de NaOH) a la composición de célula lisada separada hasta que el pH fue 9,02 y se centrifugó nuevamente la composición de célula lisada a 5.100 rpm durante 5 minutos. Esto produjo un rendimiento similar de capa lipídica. Se añadió nuevamente segunda base adicional a la composición de célula lisada separada hasta que el pH fue 10,12 y la composición de célula lisada se centrifugó nuevamente a 5.100 rpm durante 5 minutos. Nuevamente, esto produjo un rendimiento similar de capa lipídica.

Ejemplo 7

Se proporcionó un caldo de células pasteurizado (470 g) que contenía células microbianas (Nº de acceso ATCC PTA-9695). Se homogeneizó mecánicamente la biomasa de células para lisar las células y formar una composición de célula lisada emulsionada. Se trató la composición de célula lisada emulsionada con una primera base (es decir, una disolución al 25 % de NaOH) para ajustar el pH de la composición de célula lisada hasta 10,5. A continuación, se añadió una sal (NaCl sólido, en una cantidad de 2 %, en peso, de la composición de célula lisada) a la composición de célula lisada. Entonces se calentó la composición de célula lisada hasta una temperatura de 95 °C y se mantuvo a ese nivel de temperatura durante 3 horas mientras se agitaba la composición de célula lisada. Entonces se añadió una segunda base (es decir, una disolución al 25 % de NaOH) a la composición de célula lisada

5 hasta que el pH fue 8,07. Entonces se centrifugó la composición de célula lisada a 5.100 rpm durante 5 minutos para separar la composición de célula lisada y dar una capa lipídica y una capa de emulsión en donde la capa de emulsión era más grande que la capa lipídica. Para determinar si aumentar el pH incrementó el rendimiento de la capa lipídica, se añadió segunda base adicional a la composición de célula lisada separada hasta que el pH fue 9,11 y la composición de célula lisada se centrifugó nuevamente a 5.100 rpm durante 5 minutos. Esto produjo un rendimiento similar de capa lipídica. Se añadió segunda base adicional otra vez a la composición de célula lisada separada hasta que el pH fue 10,09 y se centrifugó la composición de célula lisada nuevamente a 5.100 rpm durante 5 minutos. Nuevamente, esto produjo un rendimiento similar de capa lipídica.

Ejemplo 8

10 Se usó un caldo de células que contenía células microbianas (*Cryptocodinium cohnii*) en un fermentador de ensayo de biotina reducido. Se recogieron 20.000 kg de caldo lavado, concentrado y pasteurizado. Este se sacó en el arranque la pasteurización. Se mantuvo durante aproximadamente 1 día antes de ser transferido y homogeneizado. El material se homogeneizó a 813 bares/un pase y se recogió de nuevo en un tanque de tratamiento. Mediante inspección microscópica, se estimó que se lisaron aproximadamente 80 % de las células.

15 El caldo se calentó a aproximadamente 40 °C antes de empezar el tratamiento. Se ajustó el pH a 10,5 y se añadió 2 % de NaCl y se calentó hasta 66 °C. En este momento ya se había formado una capa de aceite significativa y el pH había disminuido hasta 9,5 después de 1-2 horas. El caldo se mantuvo a 66 °C durante la noche.

20 Al día siguiente, el caldo se centrifugó en la Westfalia RSE-110 con un dique anular de 155 mm de anillo instalado. La viscosidad fue aproximadamente 180 cP a 40 °C. La centrifugadora se alimentó a 48 kg/min, con 5 -10 psi de retropresión sobre la fase ligera y 30 psi de retropresión sobre la fase pesada. La temperatura de alimentación se mantuvo a 70 °C. No estuvo presente aceite en la fase residual y solo fueron visibles algunas gotas después de que se añadiera alcohol isopropílico.

La Tabla 1 muestra los resultados de análisis realizados en el aceite en bruto obtenido de este procedimiento.

Tabla 1. Especificaciones del aceite en bruto obtenido usando el proceso del Ejemplo 8.

% de aceite	87,79
DHA (mg/g)	531,02
% de DHA	60,49
VP	1,95 (0,6*)
VA	15
% de FFA	0,18
Fósforo (ppm)	8,65
Cobre (ppm)	0,22
Hierro (ppm)	0,7
Plomo (ppm)	0,63
*VP del aceite centrifugado.	

25 De los 20.000 kg de caldo proporcionado, 10,5 % en peso (2,100 kg) fue biomasa. De la biomasa, 50 % en peso fue un aceite (1,050 kg). Del aceite, 58,9 % en peso fue DHA (618 kg). Después de realizar el proceso descrito anteriormente, hubo 592,5 kg de material en la capa lipídica, de los que aproximadamente 87,8 % en peso (520,2 kg) fueron un aceite. Así, el rendimiento de extracción de aceite de la biomasa fue 49,5 %. De ese aceite, 60,5 % en peso (314,6 kg) fue DHA, dando así como resultado un rendimiento de extracción de 51 % en peso de DHA de la biomasa.

Ejemplo 9

35 Se proporcionó un caldo de células (aproximadamente 500 g) que se lavó, se concentró y se pasteurizó que contenía células microbianas (*Schizochytrium*). El caldo se trató químicamente con una base (es decir, una disolución al 25 % de NaOH) sin una etapa previa de lisis de células. La adición de la base aumentó el pH del caldo desde 5,8 hasta 11,2. La adición de la base y el aumento en el pH lisó las células para formar una composición de célula lisada. A continuación, se añadió una sal (Na₂SO₄ sólido, en una cantidad de 5 %, en peso, de la composición

de célula lisada) a la composición de célula lisada. Entonces se calentó la composición de célula lisada hasta una temperatura en un intervalo de 90 °C a 95 °C y se mantuvo a ese nivel de temperatura durante 90 minutos y el pH de la composición de célula lisada disminuyó hasta 9,7. Después de 90 minutos hubo una capa de aceite de aproximadamente 2,5 mL por 45 mL de caldo de fermentación y no hubo pérdida de humedad. Después de 3 horas, el pH había disminuido hasta 9,2. Entonces se centrifugó la disolución a aproximadamente 5.100 rpm durante 5 minutos para separar la composición de célula lisada y dar una capa lipídica. El rendimiento de extracción del lípido fue 81 % en peso. El valor de anisidina (VA) del aceite en bruto fue 20,1. El rendimiento de rotura de las células estuvo en un intervalo de 92 % a 98 % en peso.

Ejemplo 10

Se proporcionó un caldo de células (aproximadamente 500 g) que se lavó, se concentró y se pasteurizó que contenía células microbianas (*Schizochytrium*). El caldo se trató químicamente con una base (es decir, una disolución al 25 % de NaOH) sin una etapa previa de lisis de células. La adición de la base aumentó el pH del caldo desde 4,8 hasta 11. La adición de la base y el aumento en el pH lisó las células para formar una composición de célula lisada. A continuación, se añadió una sal (NaCl sólido, en una cantidad de 2 %, en peso, de la composición de célula lisada) a la composición de célula lisada. Entonces se calentó la composición de célula lisada hasta una temperatura en un intervalo de 90 °C a 95 °C y se mantuvo a ese nivel de temperatura durante 3,5 horas y el pH de la composición de célula lisada disminuyó hasta 8,7 y no hubo pérdida de humedad. Entonces se centrifugó la disolución a aproximadamente 5.100 rpm durante 5 minutos para separar la composición de célula lisada y dar una capa lipídica. El rendimiento de extracción del lípido después de 3,5 horas fue 92 % en peso.

Se mantuvo una porción de la composición de célula lisada durante 6 horas y el pH de la composición de célula lisada disminuyó hasta 8,6. Entonces se centrifugó la disolución a aproximadamente 5.100 rpm durante 5 minutos para separar la composición de célula lisada y dar una capa lipídica. El rendimiento de extracción del lípido después de 6 horas fue 89 % en peso. El valor de anisidina (VA) del aceite en bruto fue 14,4. El rendimiento de rotura de las células fue 95 % en peso.

Ejemplo 11

Se proporcionó un caldo de células (aproximadamente 500 g) que se lavó, se concentró y se pasteurizó que contenía células microbianas (*Schizochytrium*). El caldo se trató químicamente con una base (es decir, una disolución al 50 % de NaOH) sin una etapa previa de lisis de células. La adición de la base aumentó el pH del caldo desde 5,8 hasta 11,2. La adición de la base y el aumento en el pH lisó las células para formar una composición de célula lisada. Entonces se calentó la composición de célula lisada hasta 70 °C a vacío para reducir el contenido de agua desde 88,7 % hasta 85,5 %. Durante la evaporación, el pH disminuyó hasta 10,36. Entonces se centrifugó la disolución a aproximadamente 5.100 rpm durante 5 minutos para separar la composición de célula lisada y dar una capa lipídica. El rendimiento de extracción del lípido fue 83,9 % en peso. El valor de anisidina (VA) del aceite en bruto fue 10,5. El rendimiento de rotura de las células fue 93,17 % en peso.

El proceso se repitió excepto que la composición de célula lisada se calentó hasta 70 °C a vacío para reducir el contenido de agua desde 88,7 % hasta 79,2 %. El rendimiento de extracción del lípido fue 87,5 % en peso cuando el contenido de agua se redujo hasta 79,2 % y el rendimiento de rotura de las células fue 92,3 % en peso. El proceso también se repitió para reducir el contenido de agua desde 88,7 % hasta 80,8 %. El rendimiento de extracción del lípido fue 90 % en peso cuando el contenido de agua se redujo hasta 80,8 % y el rendimiento de rotura de las células fue 95,9 % en peso.

Ejemplo 12

Se proporcionó un caldo de células (aproximadamente 500 g) que se lavó, se concentró y se pasteurizó que contenía células microbianas (*Schizochytrium*). El caldo se trató químicamente con una base (es decir, una disolución al 50 % de NaOH) sin una etapa previa de lisis de células. La adición de la base aumentó el pH del caldo desde 5,6 hasta 11,1. La adición de la base y el aumento en el pH lisó las células para formar una composición de célula lisada. Entonces se calentó la composición de célula lisada hasta 90 °C en un sistema cerrado durante 40 minutos. Después de los 40 minutos, hubo una capa de aceite de aproximadamente 1 mL (lípido) por 40 mL de caldo de fermentación. Entonces se centrifugó la disolución a aproximadamente 5.100 rpm durante 5 minutos para separar la composición de célula lisada y dar una capa lipídica. El rendimiento de extracción del lípido fue 85,1 % en peso. El valor de anisidina (VA) del aceite en bruto fue 16,3. El rendimiento de rotura de las células fue 97,6 % en peso.

Ejemplo 13

Se proporcionó un caldo de células (aproximadamente 500 g) que se lavó, se concentró y se pasteurizó que contenía células microbianas (*Schizochytrium*). El caldo se trató químicamente con una base (es decir, una disolución al 50 % de NaOH) sin una etapa previa de lisis de células. La adición de la base aumentó el pH del caldo desde 4,9 hasta 11,2. La adición de la base y el aumento en el pH lisó las células para formar una composición de célula lisada. Entonces se mezcló la composición de célula lisada a temperatura ambiente durante 4 horas. Entonces se centrifugó la disolución a aproximadamente 5.100 rpm durante 5 minutos para separar la composición de célula lisada y dar una pequeña capa lipídica.

Se mezcló una porción de la composición de célula lisada a temperatura ambiente durante aproximadamente 96 horas. Entonces se centrifugó la disolución a aproximadamente 5.100 rpm durante 5 minutos para separar la composición de célula lisada y dar una mayor capa lipídica. El rendimiento de extracción de lípido fue 61,4 % en peso. El valor de anisidina (VA) del aceite en bruto fue 22,6.

5 Ejemplo 14

Se proporcionó un caldo de células (aproximadamente 500 g) que se lavó, se concentró y se pasteurizó que contenía células microbianas (Nº de acceso ATCC PTA-9695). El caldo se trató químicamente con una base (es decir, una disolución al 50 % de NaOH) sin una etapa previa de lisis de células. La adición de la base aumentó el pH del caldo desde 5,6 hasta 11,1. La adición de la base y el aumento en el pH lisó las células para formar una composición de célula lisada. Entonces se calentó la composición de célula lisada en un intervalo de 70 °C a 75 °C durante 3 horas. Entonces se centrifugó la disolución a aproximadamente 5.100 rpm durante 5 minutos para separar la composición de célula lisada y dar una capa lipídica. El rendimiento de extracción del lípido fue 84,4 % en peso.

Se calentó una porción de la composición de célula lisada durante un total de 5 horas. Entonces se centrifugó la disolución a aproximadamente 5.100 rpm durante 5 minutos para separar la composición de célula lisada y dar una capa lipídica similar. El rendimiento de extracción de lípido fue 87,3 % en peso. El rendimiento de rotura de las células fue 89,1 % en peso.

Ejemplo 15

Se proporcionó un caldo de células (aproximadamente 500 g) que se lavó, se concentró y se pasteurizó que contenía células microbianas (*Schizochytrium*). El caldo se trató químicamente con una base (es decir, una disolución al 50 % de NaOH) sin una etapa previa de lisis de células. La adición de la base aumentó el pH del caldo desde 7,3 hasta 11. La adición de la base y el aumento en el pH lisó las células para formar una composición de célula lisada. A continuación, se añadió una sal (sólido Na₂SO₄, en una cantidad de 5 %, en peso, de la composición de célula lisada) a la composición de célula lisada. Entonces se calentó la composición de célula lisada hasta una temperatura de 90 °C y se mantuvo a ese nivel de temperatura durante 2 horas. Mientras se mantenía una temperatura de 90 °C durante 2 a 4 horas adicionales, se abrió el recipiente que contenía la composición de célula lisada para permitir la evaporación de agua. Entonces se centrifugó la disolución a aproximadamente 5.100 rpm durante 5 minutos para separar la composición de célula lisada y dar una capa lipídica. El rendimiento de extracción del lípido fue superior a 70 % en peso. El valor de anisidina (VA) del aceite en bruto fue 11,6.

Ejemplo 16

Se proporcionó un caldo de células (9.925 kg) que contenía células microbianas (Nº de acceso ATCC PTA-9695). Se diluyó el caldo de células con agua en una relación en peso 1:1 para formar un caldo diluido de 20.000 kg. El contenido de sólidos del caldo antes de la dilución fue 16,13 % en peso y después de dilución fue 8,25 % en peso. El caldo diluido se mezcló y centrifugó con una centrifugadora desenlodadora a 6.400 rpm para retirar compuestos extracelulares solubles en agua o dispersables en agua. Se recogió el concentrado (10.250 kg) de la centrifugadora y tuvo un contenido de sólidos de 10,5 % en peso. Se calentó el concentrado recogido hasta 62 °C a 64 °C para pasteurizar el concentrado. Se añadieron enzimas (es decir, Alcalasa 2,4 L FG 0,5 %) al concentrado pasteurizado para lisar las células y formar una composición de célula lisada emulsionada. Se trató la composición de célula lisada emulsionada con una base (es decir, una disolución al 25 % de NaOH) para ajustar el pH de la composición de célula lisada hasta 11. A continuación, se añadió una sal (Na₂SO₄ sólido, en una cantidad de 5 %, en peso, de la composición de célula lisada) a la composición de célula lisada. Entonces se calentó la composición de célula lisada hasta una temperatura de 95 °C y se mantuvo a ese nivel de temperatura durante 10 horas a 12 horas mientras se agitaba la composición de célula lisada. Después de la agitación, el pH de la composición de célula lisada fue 8,6 y hubo una capa de emulsión muy pequeña. Se dejó enfriar el tanque de agitación hasta 60 °C y el pH de la composición de célula lisada incrementó hasta 9,6 mientras se enfriaba. El pH de la composición de célula lisada se redujo hasta 8,2 añadiendo ácido fosfórico. La adición del ácido fosfórico no dañó la separación de la capa lipídica y la muy pequeña capa de emulsión. Entonces se centrifugó la composición de célula lisada a 5.100 rpm a una velocidad de alimentación de 48 kg/min durante 5 minutos a 60 °C a 63 °C para separar la composición de célula lisada y dar una capa lipídica que tenía un contenido de humedad de 1,7 % a 2,3 % en peso.

Ejemplo 17

Se proporcionó un caldo de células (500 g) que se lavó, se concentró y se pasteurizó que contenía células microbianas (*Cryptocodinium cohnii*). El caldo se homogeneizó a una presión de 8.000 a 12.000 psi (2 pases) para formar una composición de célula lisada. La composición de célula lisada se trató con una base (es decir, una disolución al 12,5 % de NaOH) hasta que la composición de célula lisada alcanzó un pH de 7,8 a 8,2. Se añadió una sal (Na₂SO₄ sólido, en una cantidad de 5 % en peso de la composición de célula lisada) a la composición de célula lisada. Entonces se calentó la composición de célula lisada hasta una temperatura de 60 °C y se mantuvo a esa temperatura. Se mantuvo el pH de la composición de célula lisada al nivel de 7,8 a 8,2 mediante la adición de base (es decir, una disolución al 12,5 % de NaOH) durante 10 a 15 horas en un sistema cerrado con poco a ninguna pérdida de humedad. Entonces se centrifugó la composición de célula lisada a aproximadamente 5.100 rpm durante

5 minutos para separar la composición de célula lisada y dar una capa de aceite. Esto produjo una capa de aceite de aproximadamente 2 mL en una muestra de 40 mL. El rendimiento de extracción del aceite fue 73 % en peso. El valor de anisidina (VA) del aceite en bruto fue 13,5. El rendimiento de rotura de las células fue 82 % a 86 % en peso.

Ejemplo 18

5 Se proporcionó un caldo de células pasteurizado (1.000 g) que contenía células microbianas (*Schizochytrium*). Se añadieron enzimas (es decir, Alcalasa 2,4 L FG 0,5 %) a la biomasa de células para lisar las células y formar una composición de célula lisada emulsionada. Se trató la composición de célula lisada emulsionada con una base (es decir, una disolución al 12,5 % de NaOH) para ajustar el pH de la composición de célula lisada desde 7,21 hasta 10,52. A continuación, se añadió una sal (NaCl sólido, en una cantidad de 2 %, en peso, de la composición de célula lisada) a la composición de célula lisada. Entonces se separó el caldo en 4 porciones siendo cada porción mantenida a 4 temperaturas y tiempos diferentes: 1) Ensayo N° 1 se mantuvo a 90 °C durante 22 horas; 2) Ensayo N° 2 se mantuvo a 90°C durante 2 horas y luego se mantuvo a 25 °C durante 20 horas; 3) Ensayo N° 3 se mantuvo a 60 °C durante 22 horas; y 4) Ensayo N° 4 se mantuvo a 25 °C durante 22 horas. Entonces se centrifugaron los ensayos individuales sin ajuste adicional del pH. Para los Ensayos N° 1, N° 2 y N° 3, el caldo se centrifugó a aproximadamente 6.600 rpm (una fuerza g de 4.800) durante 5 minutos para separar la composición de célula lisada. Debido a que la separación para el Ensayo N° 4 no fue buena (<20 %) a una fuerza g de 4.800, la fuerza g incrementó hasta 15.000 y el caldo se centrifugó a una fuerza g de 15.000 durante 5 minutos. El rendimiento de extracción del lípido como un porcentaje en peso y el valor de anisidina (VA) se enumeran en la tabla a continuación.

20 Tabla 2. Condiciones y resultados cuando se varía la temperatura y el tiempo de calentamiento de la composición de célula lisada.

Ensayo N°	Tiempo de tratamiento y temp.	Condiciones de centrifugación	VA	Rendimiento de aceite (%)
1	90 °C durante 22 horas	pH = 6,22 fuerza g = 4.800	58,7	51,4
2	90 °C durante 2 horas, 25 °C durante 20 horas	pH = 8,19 fuerza g = 4.800	109,2	82,2
3	60 °C durante 22 horas	pH = 8,38 fuerza g = 4.800	91,2	27,2
4	25 °C durante 22 horas	pH = 10,03 fuerza g = 15.000	105,2	55,7

Los valores de anisidina en la Tabla 2 fueron superiores a los esperados. Una diferencia entre ejemplos previos y este ejemplo era que la composición de célula lisada se dejara asentar durante un largo periodo de tiempo antes de que se extrajeran los lípidos. Se supone que el largo periodo de tiempo antes de la extracción conduce a la oxidación del oxígeno disuelto presente en la composición de célula lisada. La aumentada oxidación conduce entonces a un incremento en el valor de anisidina. El hecho que el ensayo calentado a la mayor temperatura durante el tiempo más largo (Ensayo N° 1) tuviera el valor de anisidina más bajo soporta esta hipótesis debido a que el contenido de oxígeno disuelto de una composición de célula lisada, en general, disminuye a medida que incrementa la temperatura. Se cree que los aumentados valores de anisidina son, por tanto, una anomalía era el resultado del retraso en extraer los lípidos de la composición de célula lisada. En producción, no habría retardo de tiempo en extraer los lípidos de la composición de célula lisada y los valores de anisidina estarían de acuerdo con resultados previos de valores de anisidina de 26 o menos.

Ejemplo 19

35 Se proporcionó un caldo de células pasteurizado (1.000 g) que contenía células microbianas (*Schizochytrium*). Entonces se dividió el caldo en 3 porciones y se diluyó del siguiente modo: 1) Ensayo N° 1 no se diluyó en absoluto y sirvió de porción de control porción; 2) Ensayo N° 2 se diluyó 25 % con agua; y 3) Ensayo N° 3 se diluyó 50 % con agua. Se añadieron enzimas (es decir, Alcalasa 2,4 L FG 0,5 %) a la biomasa de células para lisar las células y formar una composición de célula lisada emulsionada. Se trató la composición de célula lisada emulsionada con una base (es decir, una disolución al 12,5 % de NaOH) para ajustar el pH de la composición de célula lisada desde 6,8 hasta 10,6. A continuación, se añadió una sal (NaCl sólido, en una cantidad de 2 %, en peso, de la composición de célula lisada) a la composición de célula lisada. Entonces se calentó el caldo hasta 90 °C y se mantuvo durante 20 horas. Después del tiempo de mantenimiento, se separó el caldo para cada ensayo en dos siendo la mitad

centrifugada como tal y ajustándose el pH de la otra mitad hasta aproximadamente 8,5 antes de la centrifugación. Entonces se centrifugaron ambas porciones a aproximadamente 8.545 rpm (una fuerza g de 8.000) durante 5 minutos. El rendimiento de extracción del lípido como porcentaje en peso y el valor de anisidina (VA) se enumeran en la tabla a continuación.

5 Tabla 3. Condiciones y resultados cuando se varía la dilución del caldo pasteurizado.

Ensayo Nº	¿Diluido?	Condiciones de centrifugación	VA	Rendimiento de aceite (%)
1	Sin dilución	pH = 6,0 fuerza g = 8.000	51,8	81,2
1a	Sin dilución	pH = 8,4 fuerza g = 8.000	44,3	78,1
2	25 % de dilución con agua	pH = 5,5 fuerza g = 8.000	76,1	88,9
2a	25 % de dilución con agua	pH = 8,4 fuerza g = 8.000	85,3	82,1
3	50 % de dilución con agua	pH = 5,7 fuerza g = 8.000	68,5	85,0
3a	50 % de dilución con agua	pH = 8,5 fuerza g = 8.000	79,6	84,0

10 Los valores de anisidina en la Tabla 3 fueron superiores a los esperados. Una diferencia entre ejemplos previos (excluyendo el Ejemplo 18) y este ejemplo era que la composición de célula lisada se dejó asentar durante un largo periodo de tiempo antes de que se extrajeran los lípidos. Se supone que el largo periodo de tiempo antes de la extracción conduce a la oxidación del oxígeno disuelto presente en la composición de célula lisada. La aumentada oxidación conduce entonces a un incremento en el valor de anisidina. Se cree, por tanto, que el incremento de valores de anisidina es una anomalía que fue resultado del retraso en extraer los lípidos de la composición de célula lisada. En producción, no habría tiempo de retardo en extraer los lípidos de la composición de célula lisada y los valores de anisidina estarían de acuerdo con resultados previos de valores de anisidina de 26 o menos.

15 Ejemplo 20

Se trataron caldos de células obtenidos de diversos lotes de fermentación usando el proceso descrito en el Ejemplo 2, excepto que se variaron el momento exacto de añadir la sal (por ejemplo, antes y después de la homogenización) y la cantidad de sal. Se analizaron los lípidos separados resultantes y los análisis se proporcionan en la Tabla 4.

20 Tabla 4. Especificaciones de lípidos obtenidos usando procesos de la presente invención que varían el momento exacto de la adición de sal y la cantidad de sal añadida.

Lote de fermentación	P2137	P2137	P4167	P4167	P2137	P2137
Adición de NaCl*	Antes	Antes	Después	Después	Después	Después
% de NaCl en peso	2	5	2	5	5	5
% de lípido	27	37	51	72	59	15
% de sólidos de partida en peso	13	12,9	19,2	19,2	13,3	7,5 ⁺
% de sólidos en peso antes de la centrifugación	19,7	21,7	19,7	20,1	20,2	8,6
* La adición de NaCl fue antes o después de la homogenización; % de lípido se refiere al porcentaje de lípidos en forma de triglicérido						
+ Esta serie se diluyó para tener un bajo porcentaje de sólidos de partida.						

Los datos proporcionados en la Tabla 4 demuestran que añadir la sal después de la homogenización da como resultado mayores valores de % de lípido que añadir la sal antes de la homogenización. Los datos proporcionados en la Tabla 4 también demuestran que diluir la muestra produjo un menor valor de % de lípido.

Ejemplo 21

5 Se usó una muestra de composición de célula lisada tratada con enzima Alcalasa obtenida de células microbianas (*Schizochytrium*). La muestra tuvo un pH de aproximadamente 5,5. La muestra se dividió en 4 muestras más pequeñas y se ajustó el pH de tres de las muestras a aproximadamente 7,4, aproximadamente 10,5, y aproximadamente 12, respectivamente, añadiendo hidróxido sódico. Las muestras se diluyeron en una relación 1:1 con agua desionizada. Se añadió POBN (α -(4-piridil 1-óxido)-N-terc-butilnitrona, 1,25 M; 50 μ l) como una sustancia química de trampa de espín a 0,5 g de cada una de las muestras diluidas. Las muestras se midieron con un espectrómetro Bruker BioSpin e-scan EPR (resonancia paramagnética electrónica) (número de sistema SC0274) (Bruker BioSpin, Billerica, MA) para medir la cantidad de radicales libres presentes de la oxidación de lípidos. Se incubaron las muestras a temperatura ambiente (20 °C) y se probó 50 μ L de cada una de las muestras que contenían POBN a intervalos horarios durante cuatro horas después de ajustar los pHs usando los siguientes parámetros de espectrómetro: frecuencia de modulación de 86 Hz, amplitud de modulación de 2,11 gauss, potencia de microondas de 5,19 mW, constante de tiempo de 20,48 segundos, tiempo de barrido de 10,49 segundos, anchura de barrido de 100 gauss, y varios barridos de 8. Los resultados de las lecturas del espectrómetro de EPR se proporcionan en la FIG. 5.

20 Los datos en la FIG. 5 demuestran que inicialmente el nivel de radicales libres era más alto para la muestra a pH 5,5 y más bajo para las muestras a pH 10,5 y 12. Los datos también demuestran que durante el periodo de 4 horas la tasa de formación de radicales era más lenta para la muestra a pH 10,5 y más alta para la muestra a pH 5,5. Los datos también demuestran que la adición de una base a la composición de célula lisada inhibe la oxidación de lípidos y, por tanto, conduce a un VA bajo en el lípido en bruto y aceite refinado.

Ejemplo 22

25 Se extraen semillas oleaginosas de una planta de colza y luego se pasan a través de un molino de trituración para agrietar y romper la cascarilla externa de las semillas oleaginosas. Entonces se descascarillan las semillas oleaginosas mediante medios conocidos, tales como mediante aspiración, para retirar la carne (interior) de las semillas de la cascarilla de las semillas oleaginosas. Entonces se homogeneizan o expulsan las semillas oleaginosas descascarilladas pasándolas a través de una prensa para triturar las semillas oleaginosas descascarillas en una torta para lisar las células de las semillas oleaginosas. Agua se añade una forma una composición de célula lisada emulsionada. Se filtra la composición de célula lisada emulsionada para retirar cualquier exceso de fragmentos de cascarilla de la composición de célula lisada. La composición de célula lisada emulsionada se trata con una base (es decir, una disolución al 25 % de NaOH) para ajustar el pH de la composición de célula lisada hasta 11. A continuación se añade una sal (NaCl sólido, en una cantidad 2 % en peso de la composición de célula lisada) a la composición de célula lisada. La composición de célula lisada se calienta entonces hasta una temperatura de 90 °C y se mantuvo en ese nivel durante 6 horas a 48 horas mientras se agitaba la composición de célula lisada. La composición de célula lisada se centrifuga entonces a 5.100 rpm durante 5 minutos para separar la composición de célula lisada y dar una capa lipídica y una capa de emulsión.

Ejemplo 23

40 Análisis comparativo de lípidos en bruto obtenidos por extracción con hexano

Se analizaron los lípidos en bruto obtenidos de un lote usando el proceso descrito en el Ejemplo 2 para determinar diversas especificaciones. Se obtuvieron lípidos en bruto adicionales usando un proceso típico de extracción con hexano en la misma célula microbiana utilizada en el Ejemplo 2. El proceso de extracción con hexano incluyó secar por pulverización un caldo de fermentación, añadir hexano a la biomasa secada por pulverización para obtener una disolución de 15 % a 20 % de sólidos en peso. Entonces se homogeneizó la disolución para lisar las células para formar una composición de célula lisada. Se centrifugó la composición de célula lisada y se retiró una capa que contenía lípido y hexano. Entonces se retiró el hexano del lípido. Los resultados de los análisis se proporcionan en la Tabla 5.

Tabla 5. Especificaciones de lípidos obtenidos usando procesos de la presente invención o un proceso de extracción con hexano.

Lote de fermentación	A	B	C	D	E	F	G
Método de extracción	Ej. 2	Hexano	Hexano	Hexano	Hexano	Hexano	Hexano
VA*	5,9	ND	ND	ND	14,7	17,18	6,7
VP*	1,21	0,65	1,56	0,46	ND	0,85	0,3
% de lípido*	89,61	86,94	84,31	86,75	85,53	86,05	86,54
DHA (mg/g)	537,47	508,15	459,32	465,31	510,49	495,82	506,33
% de DHA*	59,98	58,39	54,49	53,65	59,71	57,68	58,51
* VA = Valor de anisidina; VP = valor de peróxido; % de lípido se refiere al porcentaje de lípidos en forma de triglicérido; % de DHA se refiere al porcentaje de DHA en el lípido							

5 Los datos proporcionados en la Tabla 5 demuestran que los lípidos en bruto obtenidos por los procesos de la presente invención presentan superiores valores de anisidina, porcentaje de lípido, cantidad de DHA y porcentaje de DHA en comparación con los lípidos preparados por el proceso típico de extracción con hexanos.

Análisis comparativos de lípidos en bruto obtenidos por los procesos FRIOLEX®

Ejemplo 24

10 Se analizaron los lípidos en bruto obtenidos de diversos lotes de fermentación usando los procesos descritos en los Ejemplos 1 y 3 para determinar diversas especificaciones. Se obtuvieron lípidos en bruto adicionales usando un proceso FRIOLEX® (Westfalia Separator AG, Alemania), que es un proceso de extracción de lípidos con un disolvente orgánico soluble en agua como se describe en la patente de EE. UU. N° 5.928.696 y las publicaciones internacionales N° WO 01/76385 y WO 01/76715. Los resultados de los análisis se proporcionan en la Tabla 6.

Tabla 6. Especificaciones de lípidos obtenidos usando procesos de la presente invención o un proceso FRIOLEX®.

Lote de fermentación	A	B	B	B	B	C	C	C
Extracción Método	Ej. 1	Ej. 1	Ej. 3	Ej. 1 ^a	Ej. 1 ^b	Ej. 1	Ej. 1	FRIOLEX®
VA*	3,1	1,6	3,9	300	7,1	3,5	4	36
VP*	1,8	0,17	0,14	6,16	0,34	0	0	0,35
% de lípido*	96,27	93,67	92,55	87,20	94,42	95,14	94,31	93,92
DHA (mg/g)	452,4	458,16	455,17	414,66	471,55	416,41	416,05	415,38
Rendimiento de extracción (%)	93,5	87	ND	96	ND	94	94	94
* VA = Valor de anisidina; VP = valor de peróxido; % de lípido se refiere al porcentaje de lípidos en forma de triglicéridos								
a: No se calentó la composición de célula lisada.								
b: Se dejó reposar la composición de célula lisada durante 3 semanas antes de la extracción.								

15 Los datos proporcionados en la Tabla 6 demuestran que los lípidos en bruto obtenidos por los procesos de la presente invención presentan valores de anisidina superiores (con la excepción del lípido obtenido cuando la composición de célula lisada no se calentó) en comparación con los lípidos preparados por un proceso FRIOLEX®. Los lípidos preparados por un proceso de la presente invención presentan valores de anisidina que son desde 4,4 % hasta 19,7 % de los valores de anisidina de un lípido preparado usando el proceso FRIOLEX®.

20 Se cree que un lípido preparado por un proceso de la presente invención tiene estabilidad aumentada. Por ejemplo, como se muestra en la Tabla 6, se usó un proceso de la presente invención para extraer un lípido de una composición de célula lisada, en donde la composición de célula lisada se dejó reposar durante 3 semanas antes del

proceso de extracción. Se cree que el valor de anisidina de un lípido en una composición de célula lisada incrementa con tiempo, y así, cabría esperar que un lípido extraído de una composición de célula lisada de 3 semanas de edad tuviera aumentados valores de anisidina. Sin embargo, como se muestra en la Tabla 6, el lípido obtenido de la composición de célula lisada de 3 semanas de edad usando un proceso de la presente invención tuvo un valor de anisidina que era 19,7 % del valor de anisidina de un lípido preparado por el proceso de FRIOLEX®.

Ejemplo 25

Se analizaron los lípidos en bruto obtenidos de un caldo de células microbianas (Nº de acceso ATCC PTA-9695) usando el proceso descrito en el Ejemplo 16 para determinar diversas especificaciones. Se obtuvieron lípidos en bruto adicionales de un caldo de células microbianas (Nº de acceso ATCC PTA-9695) usando un proceso FRIOLEX® (Westfalia Separator AG, Alemania), que es un proceso de extracción de lípidos con un disolvente orgánico soluble en agua (por ejemplo, alcohol isopropílico) como se describe en la patente de EE. UU. Nº 5.928.696 y las publicaciones internacionales Nº WO 01/76385 y WO 01/76715. Los resultados de los análisis se proporcionan en la Tabla 7.

Tabla 7. Comparación de lípidos en bruto

	Ejemplo 16	FRIOLEX®
% de aceite	9,19	93,73
DHA (mg/g)	570,68	574,33
% de DHA	62,1	61,27
% de FFA	1,13	0,22
VP	0	0,74
VA	10	73,9
Hierro (ppm)	0,11	0
Cobre (ppm)	0,67	0,3
Plomo (ppm)	0,21	0
Fósforo (ppm)	5,22	7,20
Rendimiento de extracción (%)	61,4	45,3

Los datos proporcionados en la Tabla 7 demuestran que los lípidos en bruto obtenidos por los procesos de la presente invención presentan valores de anisidina (VA) y valores de peróxido (VP) superiores en comparación con los lípidos preparados por un proceso FRIOLEX®. Los datos también demuestran que el rendimiento de extracción de lípido obtenido por los procesos de la presente invención es superior en comparación con el rendimiento de extracción de lípido obtenido por un proceso FRIOLEX®.

Ejemplo 26

Refinado de lípidos en bruto

Se obtuvieron lípidos en bruto usando los procesos brevemente expuestos en el Ejemplo 1 y un proceso FRIOLEX®. Se procesaron adicionalmente los lípidos en bruto por: 1) desengomado y refinado cáustico; 2) blanqueamiento; 3) filtrado en frío; y 4) desodorización con antioxidantes secuencial. Los datos para los lípidos en bruto, lípidos de refinado cáustico, lípidos blanqueados y lípidos desodorizados se presentan en las Tablas 8a y 8b. Una comparación de los aceites refinados se presenta en la Tabla 9.

Tabla 8a. Lípidos obtenidos del proceso FRIOLEX® (Ejemplo 24)

Etapa de procesamiento	FFA %	VP	VA	DHA (mg/g)	% de rendimiento (Lípido)	% de rendimiento (DHA)
Lípido en bruto	0,28	0,37	33,6	413,6	N/A	N/A
Lípido de refinado cáustico	<0,1	0,29	--	416,4	85,7	86,3
Líquido blanqueado	<0,1	0,16	13,9	413,1	71,5	70,9
Lípido filtrado	<0,1	0,19	13,3	424,86	70,3	76,0
Lípido desodorizado con AOX*	0,06	<0,1	14,3	401,5	96,6	89,4
* AOX se refiere a antioxidantes						

Tabla 8b. Lípidos obtenidos de un proceso de extracción usando NaCl (Ejemplo 1)

Etapa de procesamiento	FFA %	VP	VA	DHA (mg/g)	% de rendimiento (Lípido)	% de rendimiento (DHA)
Lípido en bruto	1,36	0	3,5	406,7	N/A	N/A
Lípido de refinado cáustico	<0,1	0,27	2,3	410,8	85,9	86,7
Líquido blanqueado	<0,1	0,16	0,8	404,3	97,0	95,5
Lípido filtrado	<0,1	0,37	1,0	414,1	59,3	60,7
Lípido desodorizado con AOX	0,06	<0,1	1,8	379,9*	94,9	87,1
*Nota: La aumentada dilución con aceite de girasol de alto oleico (HOSO) era el motivo para la disminución en DHA (mg/g).						

5

Tabla 9. Comparación de aceites refinados

	FRIOLEX® (Ejemplo 24)	Ejemplo 1
DHA (mg/g)	401,5	379,9*
% de DHA	42,69	40,18
FFA %	0,06	0,06
VP	<0,1	<0,1
VA	14,3	1,8
Hierro (ppm)	0,05	<0,02
Cobre (ppm)	<0,02	<0,02
Plomo (ppm)	<0,1	<0,1
Arsénico (ppm)	<0,1	<0,1
Mercurio (ppm)	<0,01	<0,01
% de humedad y volátiles	<0,01	<0,01
Insaponificables (%)	1,17	1,33
Ácido graso trans por IR (%)	<1	<1
*Nota: La aumentada dilución con HOSO era el motivo para la disminución en DHA (mg/g).		

Los datos proporcionados en la Tabla 8a, Tabla 8b y Tabla 9 demuestran que un aceite refinado preparado por un proceso de la presente invención presenta valores de anisidina más bajos en comparación con un aceite refinado preparado por el proceso FRIOLEX®.

Ejemplo 27

5 Comparación del perfil sensorial

Se analizaron los aceites refinados obtenidos en el Ejemplo 26 por un panel de 8 a 12 analistas sensoriales. Los analistas sensoriales clasificaron diversas especificaciones de lípidos basándose en el aroma, aromáticos y regusto para proporcionar una "intensidad de aroma global" para cada lípido. Se usó el método de análisis descriptivo de Espectro Universal para evaluar las características de aroma y de aromáticos de las muestras. Este método usa una
 10 escala de intensidad de 0 - 15, donde 0 = ninguno detectado y 15 = intensidad muy alta, para medir los atributos de aroma y de aromáticos de los aceites. Los resultados de los datos sensoriales se proporcionan en la Tabla 10.

Tabla 10. Especificaciones sensoriales de un lípido preparado por el proceso FRIOLEX® (Ejemplo 24) y un lípido preparado por un proceso de la presente invención (Ejemplo 1)

Especificaciones							
Aroma							
	Intensidad global	Complejo marino con olor a pescado	Complejo verde	Herbáceo	Tostado a nuez	A pintura	Otro
FRIOLEX®	3	1	1	1	0	0	0
Ej. 1	2	0	1	1	0	0	0
Aromáticos							
	Intensidad global	Complejo marino con olor a pescado	Complejo verde	Herbáceo	Tostado a nuez	A pintura	Otro
FRIOLEX®	4	1	1	2	0	0	0
Ej. 1	3	0	1	2	0	0	0
Regusto							
FRIOLEX®	Herbal/ligeramente a pescado						
Ej. 1	Herbal						

15 Los datos proporcionados en la Tabla 10 demuestran que un aceite refinado preparado por un proceso de la presente invención presenta datos sensoriales superiores en comparación con un aceite refinado preparado por el proceso FRIOLEX®. Como se muestra anteriormente, los lípidos proporcionados por la presente invención tuvieron una intensidad de aroma global de 3 y 2, mientras que los lípidos FRIOLEX® proporcionaron una intensidad de aroma global de 4 y 3, respectivamente.

20 **Ejemplo 28**

Ejemplo comparativo

Se desvela un proceso de extracción para la obtención de lípidos de microorganismos sin el uso de un disolvente orgánico en la patente de EE. UU. Nº 6.750.048. Se proporciona en la Tabla 11 una comparación de un aceite refinado obtenido de un lípido en bruto preparado por un proceso de la presente invención y un aceite refinado
 25 obtenido de un lípido en bruto preparado por el proceso de extracción desvelado en la patente de EE. UU. Nº 6.750.048.

Tabla 11. Datos comparativos para un lípido preparado por un proceso de la presente invención (Ejemplo 1) y un lípido preparado por un proceso desvelado en la patente de EE. UU. N° 6.750.048.

	Ejemplo 1	U.S.P.N. 6.750.048
DHA (mg/g)	379,9	346
% de DHA	40,18	37,3
FFA %	0,06	ND
VP	<0,1	0,46
VA	1,8	ND
Hierro (ppm)	<0,02	0,26
Cobre (ppm)	<0,02	<0,05
Plomo (ppm)	<0,1	<0,20
Arsénico (ppm)	<0,1	<0,20
Mercurio (ppm)	<0,01	<0,20
% de humedad y volátiles	<0,01	0,02
Insaponificables (%)	1,33	ND
Ácido graso trans por IR (%)	<1	ND

- 5 Los datos proporcionados en la Tabla 11 demuestran que un aceite refinado obtenido de un lípido en bruto preparado por un proceso de la presente invención presenta propiedades superiores en comparación con un aceite refinado obtenido de un lípido en bruto preparado por el proceso de extracción desvelado en la patente de EE. UU. N° 6.750.048.

Ejemplo 29

Se caracterizó el traustequitridio aislado (N° de acceso ATCC PTA-9695) para clasificación taxonómica.

- 10 Se recogieron muestras de hábitats de debajo de las mareas durante la marea baja. Se dispusieron agua, sedimento, material vegetal vivo y residuos vegetales/animales en descomposición en tubo estériles de 50 mL. Se extendieron porciones de cada muestra junto con el agua sobre placas de agar sólido de medio de aislamiento. El medio de aislamiento consistió 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 de 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 B₁₂), 1 mL de una disolución de oligominerales (metales PII, que contienen por litro: 6,0 g de FeCl₃6H₂O, 6,84 g de H₃BO₃, 0,86 g de MnCl₂4H₂O, 0,06 g de ZnCl₂, 0,026 de CoCl₂6H₂O, 0,052 g de NiSO₄H₂O, 0,002 g de CuSO₄5H₂O y 0,005 g de Na₂MoO₄2H₂O), y 500 mg de cada uno de penicilina G y sulfato de estreptomycin. Se incubaron en la oscuridad las placas de agar a 20-25 °C. Después de 2-4 días, se examinaron las placas de agar con aumento, y se seleccionaron colonias de
- 15 células con un palillo estéril y se volvieron a extender sobre una placa nueva de medio. Se extendieron repetidamente las células sobre medio nuevo hasta que se retiraron los organismos contaminados.

- 20 Se transfirieron colonias de placas de agar a placas de Petri con agua de mar a la mitad de concentración y (1 mL) de una suspensión de larvas de gambas en salmuera esterilizadas en autoclave y recién eclosionadas. Las larvas de gambas en salmuera llegaron a crecer excesivamente con agrupaciones de esporangios después de 2-3 días. Las zoosporas liberadas fueron biflageladas en la descarga, nadando activamente lejos del esporangio maduro, cuyos restos de pared son claramente visibles (en contraste de fase) después de la liberación de esporas. Los esporangios midieron 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 extendieron y rápidamente experimentaron divisiones binarias que conducen a tétradas, óctadas, y finalmente a agrupaciones de esporangios.
- 25 La formación de tétradas comenzó en una etapa muy temprana antes de la madurez de los esporangios. Estas características están de acuerdo con el género *Schizochytrium*.

- 30 El traustequitridio aislado (N° de acceso ATCC PTA-9695) se caracterizó además basándose en la similitud de su gen ARNr 18s con la de especies conocidas. Se preparó el ADN genómico total del traustequitridio (N° de acceso ATCC PTA-9695) mediante procedimientos convencionales (Sambrook J. y Russell D. 2001. Molecular cloning: A

laboratory manual, 3ª edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York) y se usó para amplificación por PCR del gen ARNr 18s. La amplificación por PCR del gen ARNr 18s se llevó a cabo con los cebadores previamente descritos (Honda et. al., J. Eukaryot. Microbiol. 46(6) 1999). Las condiciones de PCR con molde de ADN cromosómico fueron las siguientes: dNTPs 0,2 μM, 0,1 uM de cada cebador, 8 % de DMSO, 200 ng de ADN cromosómico, 2,5 U de ADN polimerasa PfuUltra® II fusion HS (Stratagene), y 1X tampón PfuUltra® (Stratagene) en un volumen total de 50 μL. El protocolo de 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) repetir las etapas 2-4 durante 40 ciclos; (6) 72 °C durante 5 minutos; y (7) mantener a 6 °C.

La amplificación por PCR dio un producto de ADN distinto con el tamaño esperado usando el molde cromosómico descrito anteriormente. Se clonó el producto de PCR en el vector pJET1.2/blunt (Fermentas) según las instrucciones del fabricante, y se determinó la secuencia usando cebadores convencionales suministrados.

La Tabla 12 muestra una comparación de la secuencia de ARNr 18s del traustoquitridio (Nº de acceso ATCC PTA-9695) con secuencias de ADN en la base de datos electrónica del Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI). Brevemente, se determinó el "% de identidad" por la matriz de puntuación "swgapdnamt" dentro del programa "AlignX" del programa VectorNTI (Invitrogen), un patrón para el alineamiento de ADN. Se tomó el "% de cobertura" de los resultados de un cálculo de Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) de la base de datos electrónica de NCBI y es el porcentaje de la longitud de búsqueda que se incluye en los segmentos alineados.

Tabla 12: Comparación de secuencias de ARNr 18s

Traustoquitridios	% de identidad Cálculo Nº 1	% de cobertura Cálculo Nº 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 12, se encontró que, en términos de % de identidad, la secuencia del gen ARNr 18s del traustoquitridio (Nº de acceso ATCC PTA-9695) está estrechamente relacionada, aunque no es idéntica, a la secuencia del gen ARNr 18s de *T. aggregatum* proporcionada en Honda, D. et al., J. Euk. Micro. 46(6): 637-647 (1999). La secuencia de ARNr 18s publicada para *Thraustochytrium aggregatum* es una secuencia parcial, con un hueco de aproximadamente 71 nucleótidos de ADN en el centro de la secuencia. En términos de porcentaje de cobertura, la secuencia del gen ARNr 18s de la cepa aislada de la invención está más estrechamente relacionada con *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 que con *T. aggregatum*.

Se han usado ampliamente proteínas altamente conservadas tales como actina y beta-tubulina, junto con el gen ARNr 18s, como marcadores para evaluar las relaciones filogenéticas entre organismos (Baldauf, S. M. Am. Nat. 154, S178 (1999)). También se usó ADN genómico total del traustoquitridio (Nº de acceso ATCC PTA-9695) como molde para amplificación por PCR de tanto los genes de actina como de beta-tubulina. Se llevó a cabo la amplificación por PCR con cebadores diseñados para regiones conservadas de las secuencias de actina y beta-tubulina de ADN de *T. aggregatum*.

Las condiciones de PCR con molde de ADN cromosómico fueron del siguiente modo: dNTPs 0,2 μM, 0,1 uM de cada cebador, 8 % de DMSO, 200 ng de ADN cromosómico, 2,5 U de ADN polimerasa Herculase® II fusion (Stratagene), y 1X de tampón Herculase® (Stratagene) en un volumen total de 50 μL. El protocolo de 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) repetir las etapas 2-4 durante 40 ciclos; (6) 72 °C durante 5 minutos; y (7) mantener a 6 °C.

La amplificación por PCR dio productos de ADN distintos con los tamaños esperados usando el molde cromosómico descrito anteriormente. Se clonaron los productos de PCR respectivos en el vector pJET1.2/blunt (Fermentas) según las instrucciones del fabricante, y se determinaron las secuencias de inserción de cada una usando cebadores convencionales suministrados.

La Tabla 13 muestra las identidades para la secuencia de aminoácidos de actina del traustoquitridio (Nº de acceso ATCC PTA-9695) en comparación con las secuencias de actina disponibles en la base de datos pública. Se

determinaron las identidades mediante el uso de la matriz de puntuación "blosum62mt2" dentro del programa "AlignX" del programa VectorNTI, un patrón para el alineamiento de proteínas.

Tabla 13: Comparación del % de identidades de la secuencia de proteínas de actina

Traustoquitridios	% de identidad
<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

- 5 La Tabla 14 muestra las identidades para la secuencia de aminoácidos de beta-tubulina del traustoquitridio (Nº de acceso ATCC PTA-9695) en comparación con las secuencias de beta-tubulina disponibles en la base de datos pública. Se determinaron identidades mediante el uso de la matriz de puntuación "blosum62mt2" dentro del programa "AlignX" del programa VectorNTI, un patrón para el alineamiento de proteínas.

Tabla 14: Comparación del % de identidades de la secuencia de proteínas de beta-tubulina

Traustoquitridios	% de identidad
<i>Aplanochytrium kerguelense</i>	100
<i>Aplanochytrium stocchini</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. Nº 32</i>	100
<i>Thraustochytriidae sp. PW19</i>	100
<i>Schizochytrium aggregatum</i>	100
<i>Schizochytrium sp. ATCC 20888</i>	100

10

Basándose en las caracterizaciones anteriores, se cree que el traustoquitridio aislado (Nº de acceso ATCC PTA-9695) representa una nueva especie de *Schizochytrium* y, por tanto, también se designa *Schizochytrium sp. ATCC PTA-9695*.

Ejemplo 30

- 15 El traustoquitridio aislado (Nº de acceso ATCC PTA-9695) produjo altos niveles de crecimiento celular en condiciones de cultivo variables, como se describe a continuación. En la Tabla 15 se muestran medios y condiciones de cultivo típicas. Por tanto, se observaron altos niveles de ácidos grasos y DHA (es decir, más de 50 % en peso del peso de células secas fueron ácidos grasos y más de 50 % en peso del éster metílico de ácidos grasos fue DHA).

ES 2 758 782 T3

Tabla 15: Medio del recipiente

<u>Ingrediente</u>	<u>concentración</u>	<u>intervalos</u>
NaCl	g/L	12,5 0-25,5-20, o 10-15
KCl	g/L	1,0 0-5, 0,25-3, o 0,5-2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	g/L	5,0 0-10, 2-8, o 3-6
(NH ₄) ₂ SO ₄	g/L	0,6 0-10, 0,25-5, o 0,5-3
CaCl ₂	g/L	0,29 0,1-5, 0,15-3, o 0,2-1
T 154 (extracto de levadura)	g/L	6,0 0-20, 1-15, o 5-10
KH ₂ PO ₄	g/L	1,2 0,1-10, 0,5-5, o 1-3
<u>Post-autoclave (Metales)</u>		
Ácido cítrico	mg/L	3,5 0,1-100, 1-50, o 2-25
FeSO ₄ ·7H ₂ O	mg/L	10,30 0,1-100, 1-50, o 5-25
MnCl ₂ ·4H ₂ O	mg/L	3,10 0,1-100, 1-50, o 2-25
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	mg/L	3,10 0,1-100, 1-50, o 2-25
CoCl ₂ ·6H ₂ O	mg/L	0,04 0,001-1, 0,005-0,5, o 0,01-0,1
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	mg/L	0,04 0,001-1, 0,005-0,5, o 0,01-0,1
CuSO ₄ ·5H ₂ O	mg/L	2,07 0,1-100, 0,5-50, o 1-25
NiSO ₄ ·6H ₂ O	mg/L	2,07 0,1-100, 0,5-50, o 1-25
<u>Post-autoclave (Vitaminas)</u>		
Tiamina	mg/L	9,75 0,1-100, 1-50, o 5-25
Vitamina B12	mg/L	0,16 0,1-100, 0,1-10, o 0,1-1
½-Pantotenato de Ca	mg/L	3,33 0,1-100, 0,1-50, o 1-10
<u>Post-autoclave (Carbono)</u>		
Glucosa	g/L	30,0 5-150, 10-100, o 20-50
<u>Alimentación de nitrógeno:</u>		
<u>Ingrediente</u>	<u>Concentración</u>	
NH ₄ OH	mL/L	21,6 0-150, 10-100, o 15-50

Condiciones de cultivo típicas incluirían las siguientes:

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	aproximadamente 5 - aproximadamente 100 % de saturación, aproximadamente 10 -

disuelto: aproximadamente 80 % de saturación, o aproximadamente 20 - aproximadamente 50 % de saturación

glucosa aproximadamente 5 - aproximadamente 50 g/L, aproximadamente 10 - aproximadamente 40 g/L,
controlada a: o aproximadamente 20 - aproximadamente 35 g/L.

5 En cultivos alimentados con carbono y nitrógeno con 8200 ppm de Cl⁻ a 22,5 °C con 20 % de oxígeno disuelto a pH 7,0, la cepa aislada produjo un peso de células secas de 140 g/L después de 7 días de cultivo, con un contenido de ácidos grasos de 70 % en peso. Se usó alimentación de amoníaco en bucle cerrado y el pH se mantuvo a 7,0. La productividad del 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 3640 ppm de Cl⁻ a 22,5 °C con 20 % de oxígeno disuelto a pH 7,0, la cepa aislada produjo un peso de células secas de 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.

10 En cultivos alimentados con carbono y nitrógeno con 980 ppm de Cl⁻ a 22,5 °C con 20 % de oxígeno disuelto a pH 7,0, la cepa aislada produjo un peso de células secas de 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 31

15 Se extrajeron aceites de una muestra de biomasa (Muestra A) del traustoqueitridio aislado (Nº de acceso ATCC PTA-9695). La muestra de biomasa se produjo en un cultivo alimentado con carbono y nitrógeno con 980 ppm de Cl⁻ a 22,5 °C con 20 % de oxígeno disuelto a pH 7,0. Se extrajeron aceites de la muestra de biomasa A por el proceso de extracción con hexano dando la Muestra A1 de aceite microbiano. Brevemente, se molió biomasa seca con hexano usando tubos de acero inoxidable y rodamientos de acero inoxidable durante aproximadamente 2 horas. Se filtró la
20 suspensión a vacío y se recogió el filtrado. Se retiró el hexano usando un evaporador rotatorio. También se extrajeron aceites de la muestra de biomasa A usando el proceso FRIOLEX® (GEA Westfalia Separator UK Ltd., Milton Keynes, Inglaterra) dando la Muestra A2 de aceite microbiano. Se aislaron clases individuales de lípidos de las Muestras A1 y A2 de aceites microbianos usando cromatografía ultrarrápida 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) como ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME).
25

Cromatografía ultrarrápida - Se usó cromatografía ultrarrápida para separar las clases de lípidos presentes en los aceites en bruto, y para determinar el porcentaje en peso de cada clase presente en los aceites. El sistema de cromatografía utilizó el gel de sílice 60 (EMD Chemical, Gibbstown, NJ) con fase móvil compuesta de éter de petróleo y acetato de etilo a 3 mL/min. Se usó un gradiente de etapa para eluir selectivamente cada clase de lípido de la columna. El gradiente de fase móvil empezó desde 100 % de éter de petróleo y terminó con 50 % de acetato de etilo (seguido por un lavado con 100 % de metanol). Se recogieron las fracciones en tubos de ensayo de 10 mL usando un colector de fracciones de lecho grande Gilson FC 204 (Gilson, Inc., Middleton, WI). Cada tubo se analizó por cromatografía en capa fina (CCF) y se reunieron los tubos que contenían clases de lípidos individuales (como se determina por manchas individuales sobre la placa de CCF con factor de retención esperado (R_f)), se concentraron a sequedad y se pesaron. Entonces se determinó gravimétricamente el contenido de fracción total.
30
35

Análisis de CCF - Se realizó cromatografía en capa fina sobre placas de gel de sílice. Se eluyeron las placas usando un sistema de disolventes que consistía en éter de petróleo : etil éter : ácido acético (80:20:1) y se visualizaron usando vapor de yodo. Entonces se compararon los valores de R_f de cada mancha con los valores bibliográficos informados para cada clase de lípido.

40 *Análisis de ácidos grasos* - Se analizaron las muestras de biomasa y clases de lípidos aislados para la composición de ácidos grasos como FAMES. Se pesaron directamente las muestras en tubos de ensayo de tapa roscada, y se añadió a cada tubo 1 mL de patrón interno C19:0 (Un-Chek, Elysian, MN) en tolueno y 2 mL de HCl 1,5 N en metanol. Los tubos se agitaron con vórtex brevemente y se dispusieron en un bloque térmico durante 2 horas a 100 °C. Se sacaron los tubos del bloque térmico, se dejó que se enfriaran y se añadió 1 mL de NaCl saturado en agua. Los tubos se agitaron nuevamente con vórtex, se centrifugaron y se dispuso una porción de la fase superior (orgánica) en un vial de CG y se analizó por GC-FID. Se cuantificaron los FAMES usando una curva de calibración estándar interna de 3 puntos generada usando el patrón de referencia GLC de Nu-Chek-Prep (Nu-Chek Prep, Inc., Elysian, MN) y se identificaron provisionalmente basándose en el tiempo de retención. Los ácidos grasos presentes se expresaron como mg/g y % de FAMES totales.
45

50 Se preparó la Muestra A1 disolviendo el aceite en bruto en hexano y aplicando a la cabeza de la columna. Después del fraccionamiento de la muestra usando cromatografía ultrarrápida, la fracción de ésteres de esteroles representó 1,2 % en peso, la fracción de triacilgliceroles (TAG) representó 82,7 % en peso, la fracción de ácidos grasos libres (FFA) representó 0,9 % en peso, y la fracción de diacilgliceroles (DAG) representó 2,9 % en peso del aceite en bruto.

ES 2 758 782 T3

Los perfiles de ácidos grasos totales del aceite en bruto de la Muestra A1 y las fracciones aisladas se muestran a continuación en la Tabla 16 y la Tabla 17, calculados como mg/g y % de FAME, respectivamente.

Tabla 16: Perfiles de ácidos grasos de la Muestra A1 calculados como miligramos por gramo de FAME

	Biomasa	Aceite en bruto	Ésteres de esterol	TAG	FFA	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
C18:3N3*	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
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
C20:4N6*	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

ES 2 758 782 T3

	Biomasa	Aceite en bruto	Ésteres de esteroil	TAG	FFA	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)
C22:6 N3*	253,5	569,7	107,3	556,5	352,8	451,4
Suma de todos los FAMES	408,6	934,0	435,4	958,0	620,1	786,4

Tabla 17: Perfiles de ácidos grasos de la Muestra A1 como un porcentaje de FAMES totales

	Biomasa	Aceite en bruto	Ésteres de esteroil	TAG	FFA	DAG
Ácido graso	% de FAME	% de FAME	% de FAME	% de FAME	% de FAME	% de 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
C18:1 N9*	0,0	0,4	0,4	0,3	0,2	0,4
C18:1N7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C18:2N6*	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
C18:4N3	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

ES 2 758 782 T3

	Biomasa	Aceite en bruto	Ésteres de esteroles	TAG	FFA	DAG
Ácido graso	% de FAME	% de FAME	% de FAME	% de FAME	% de FAME	% de FAME
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 % de FAMES	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

5 Se preparó la Muestra A2 disolviendo el aceite en bruto en hexano y aplicando a la cabeza de la columna. Después del fraccionamiento de la muestra usando cromatografía ultrarrápida, la fracción de ésteres de esteroles representó 0,8 % en peso, la fracción de triacilglicérols (TAG) representó 83,4 % en peso, la fracción de ácidos grasos libres (FFA) representó 1,8 % en peso, y la fracción de diacilglicérols (DAG) representó 5,6 % en peso del aceite en bruto. Los perfiles de ácidos grasos totales del aceite en bruto de la Muestra A2 y las fracciones aisladas se muestran a continuación en la Tabla 18 y Tabla 19 calculados como mg/g y % de FAME, respectivamente.

Tabla 18: Perfiles de ácidos grasos de la Muestra A2 calculados como miligramos por gramo de FAME

	Biomasa	Aceite en bruto	Ésteres de esteroles	TAG	FFA	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
C18:4N3	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

ES 2 758 782 T3

	Biomasa	Aceite en bruto	Ésteres de esterol	TAG	FFA	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)
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
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 FAMES	408,6	926,5	362,3	951,3	730,4	672,5

Tabla 19: Perfiles de ácidos grasos de la Muestra A2 como un porcentaje de FAMES totales

	Biomasa	Aceite en bruto	Ésteres de esterol	TAG	FFA	DAG
Ácido graso	% de FAME	% de FAME	% de FAME	% de FAME	% de FAME	% de 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
C18:2N6*	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

	Biomasa	Aceite en bruto	Ésteres de esterol	TAG	FFA	DAG
C20:1 N9*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C18:4N3	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 del % de FAMES	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Se observa que las Muestras A1 y A2 se extrajeron usando una extracción típica con hexano y un proceso FRIOLEX®, respectivamente. Se espera que los perfiles de ácidos grasos de las Tablas 16-19 sean sustancialmente los mismos si las muestras se extraen usando los procesos de la presente invención.

5 Ejemplo 32

Después de extraer el aceite del caldo de fermentación usando el proceso Friolex, como se describen en el Ejemplo 31, el aceite en bruto se procesó adicionalmente mediante etapas de refinado, blanqueamiento y desodorización para obtener un aceite final. El aceite final se diluyó con aceite de girasol de alto oleico para obtener aceite comercial preparado con un alto contenido de DHA de aproximadamente 400 mg/g. Se aislaron 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).

Cromatografía ultrarrápida - Se usó cromatografía ultrarrápida para separar las clases de lípidos presentes en el aceite final, y para determinar el porcentaje en peso de cada clase presente en el aceite. El sistema de cromatografía utilizó el gel de sílice 60 (EMD Chemical, Gibbstown, NJ) con fase móvil compuesta de éter de petróleo y acetato de etilo a 3 mL/min. Se usó un gradiente de etapa para eluir selectivamente cada clase de lípido de la columna. El gradiente de fase móvil empezó desde 100 % de éter de petróleo y terminó con 50 % de acetato de etilo (seguido por un lavado con 100 % de metanol). Se recogieron las fracciones en tubos de ensayo de 10 mL usando un colector de fracciones de lecho grande Gilson FC 204 (Gilson, Inc., Middleton, WI). Cada tubo se analizó por cromatografía en capa fina (CCF) y se reunieron los tubos que contenían clases de lípidos individuales (como se determina por manchas individuales sobre la placa de CCF con factor de retención esperado (Rf)), se concentraron a sequedad y se pesaron. Entonces se determinó gravimétricamente el contenido de fracción total.

Análisis de CCF - Se realizó cromatografía en capa fina sobre placas de gel de sílice. Se eluyeron las placas usando un sistema de disolventes que consistía en éter de petróleo : etil éter : ácido acético (80:20:1) y se visualizaron usando vapor de yodo. Entonces se compararon los valores de Rf de cada mancha con los valores bibliográficos informados para cada clase de lípido.

- 5 *Análisis de ácidos grasos* – Se analizaron la muestra de aceite final y las clases de lípidos aislados para la composición de ácidos grasos como FAMES. Se pesaron directamente las muestras en tubos de ensayo de tapa roscada, y se añadió a cada tubo 1 mL de patrón interno C19:0 (NuCheck, Elysian, MN) en tolueno y 2 mL de HCl 1,5 N en metanol. Los tubos se agitaron con vórtex brevemente y se dispusieron en un bloque térmico durante 2 horas a 100 °C. Se sacaron los tubos del bloque térmico, se dejó que se enfriaran y se añadió 1 mL de NaCl saturado en agua. Los tubos se agitaron nuevamente con vórtex, se centrifugaron, y se dispuso una porción de la fase superior (orgánica) en un vial de CG y se analizó por GC-FID. Se cuantificaron los FAMES usando una curva de calibración estándar interna de 3 puntos generada usando el patrón de referencia GLC de Nu-Chek-Prep (Nu-Chek Prep, Inc., Elysian, MN) y se identificaron provisionalmente basándose en el tiempo de retención. Los ácidos grasos presentes se expresaron como mg/g y % de FAMES totales.
- 10
- 15 Se preparó la muestra disolviendo 250 mg de aceite final en 600 µL de hexano y aplicando a la cabeza de la columna. Después del fraccionamiento de la muestra usando cromatografía ultrarrápida, la fracción de ésteres de esteroles representó 1,2 % en peso, la fracción de triacilglicéridos (TAG) representó 92,1 % en peso, la fracción de ácidos grasos libres (FFA) representó 2,1 % en peso, la fracción de esteroides representó 1,1 %, la fracción de diacilglicéridos (DAG) representó 2,8 % en peso del aceite final.
- 20 El análisis por CCF de las fracciones reunidas mostró que las fracciones de FFA y esteroides se mezclaron con TAG y DAG, respectivamente. Los perfiles de ácidos grasos totales del aceite final por FRIOLEX® y las fracciones aisladas se muestran a continuación en la Tabla 20 y la Tabla 21 calculadas como mg/g y % de FAME, respectivamente.

Tabla 20: Perfil de ácidos grasos calculado como miligramos por gramo de FAME

	Aceite final	Ésteres de esteroles	TAG	FFA	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
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

ES 2 758 782 T3

	Aceite final	Ésteres de esteroles	TAG	FFA	Esterol	DAG
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	30	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 FAMES	936,1	572,1	967,6	688,0	797,3	737,3

Tabla 21: Perfiles de ácidos grasos como un porcentaje de FAMES totales

	Aceite final	Ésteres de esteroles	TAG	FFA	Esterol	DAG
Ácido graso	% de FAME	% de FAME	% de FAME	% de FAME	% de FAME	% de 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

	Aceite final	Ésteres de esteroles	TAG	FFA	Esterol	DAG
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
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	59,1
Suma de % de FAMES	100	100	100	100	100	100

Se observa que los perfiles de ácidos grasos de las Tablas 20 y 21 se obtuvieron de muestras extraídas usando un proceso FRIOLEX®. Se espera que los perfiles de ácidos grasos de las Tablas 20 y 21 sean sustancialmente los mismos si las muestras se extrajeron usando los procesos de la presente invención.

5 Ejemplo 33

Se preparó un matraz de inóculo de dos días de edad del traustoitridio aislado (Nº de acceso ATCC PTA-9695) en un cultivo alimentado con carbono y nitrógeno con 980 ppm de Cl⁻ (medio de traustoitridio).

Se llevó a cabo la mutagénesis según el siguiente procedimiento:

10 Se vertió un matraz estéril de T=2 días de edad, aproximadamente 50 mL, en un homogeneizador estéril de vidrio de 40 mL. El cultivo recibió 50 emboladas en el homogeneizador. Se pipeteó el cultivo y se filtró a través de un filtro de malla estéril de 50 micrómetros, que se dispuso en un tubo estéril de 50 mL (la malla se usó como un medio de retención de grupos más grandes de colonias mientras se permitía que las agrupaciones más pequeñas y las células individuales pasaran a través de la malla de 50 micrómetros). Se recogió todo el lote de macerado concentrado en un tubo estéril de 50 mL. Se agitó con vórtex el cultivo macerado y se hicieron diluciones a niveles de hasta 1:100

15 veces en tubos que contenían medio de traustoitridio. Se agitaron con vórtex las muestras maceradas diluidas antes de añadir 200 µL de inóculo a una placa de Petri de medio de agar de traustoitridio, 100 x 15 mm, que contenía 4-5 perlas de vidrio (perlas de vidrio de 3 mm). Cada placa se agitó suavemente en un esfuerzo por que las perlas extiendan el inóculo uniformemente alrededor de la placa. Se tiraron las perlas de las placas y se dejó que las placas se asentaran con tapas encima durante aproximadamente 5 minutos para el secado. Se apagaron las luces

20 en tanto la campana estéril como las áreas limítrofes ya que el procedimiento se realizó en luz tenue. Hubo luz mínima disponible para ser capaces de realizar el procedimiento pero solo indirecta y tenue.

25 Se dispusieron cinco placas por duplicado sobre la base del reticulador XL (Spectronics Corporation, Nueva York) con las tapas quitadas mientras que se irradiaron las muestras. El reticulador suministró potencia en términos de microjulios y se buscó un nivel que alcanzara una destrucción de 90 %-95 %. Se inocularon cinco placas de control por duplicado con células no mutagenizadas usando el mismo protocolo. Se usaron estas cifras de células para

calcular el % de destrucción. Una vez terminó la irradiación, se sacaron las placas, se cambiaron las tapas, y se envolvieron las placas en parafilm seguido por una envoltura en lámina de aluminio. Fue fundamental que las placas crecieran hasta la primera semana en la oscuridad de manera que no fueran capaces de reparar los genes dañados.

Se dispusieron las placas en una sala a 22,5°C durante aproximadamente 10 días antes de contar las colonias.

- 5 Cuando se hicieron los recuentos finales, se seleccionaron las colonias individuales con un bucle de inoculación estéril y se volvieron a extender sobre nuevas placas de medio de traustoquitridios. Se sembró cada colonia sobre una placa individual. A medida que las placas crecieron en densidad, se tomó una muestra, usando un bucle de inoculación, y se inocularon en un matraz oscilante estéril de 250 mL que contenía 50 mL de medio de traustoquitridio. Este matraz se dispuso en un agitador a 200 rpm en una sala de 22,5 °C. En T=7 días, se recogió el
- 10 cultivo de matraz oscilante en un tubo estéril de 50 mL. Se tomó el pH y se centrifugó la muestra para recoger el sedimento de biomasa. Se aclaró cada muestra y se resuspendió en una mezcla 50:50 de alcohol isopropílico y agua destilada antes de ser nuevamente centrifugada. Se liofilizó el sedimento recogido, se pesó, y se realizó un análisis de FAME. Los datos en las Tablas 22-28 representan mutantes producidos con el proceso anterior.

15

Tabla 22: Mutantes de la cepa de traustoitridio N° de acceso ATCC PTA-9695

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

Acidos grasos	ATCC PTA-9695 de control	Mutante 1	Mutante 2	Mutante 3	Mutante 4	Mutante 5	Mutante 8	Mutante 9	Mutante 10
% de 18:3 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 18:4 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:0	0,39	0,36	0,42	0,45	0,34	0,46	0,37	0,40	0,40
% de 20:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:3 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:3 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:3 n-3	0,37	0,38	0,32	0,42	0,44	0,32	0,41	0,33	0,36
% de 20:4 ARA	0,55	0,55	0,94	0,57	0,80	0,89	0,60	0,73	0,75
% de 20:5 n-3 EPA	2,62	2,94	3,01	2,40	3,64	2,83	2,54	2,81	2,81
% de 22:0	0,08	0,08	0,09	0,09	0,07	0,10	0,07	0,09	0,09
% de 22:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 22:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 22:3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 22:4 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 22,5 n-6	319	3,19	2,94	3,43	3,35	2,87	3,34	3,01	3,15
% de 22,5 n-3	0,18	0,18	0,21	0,23	0,20	0,18	0,20	0,17	0,18
% de 22:6 n-3 DHA	56,88	58,63	57,56	57,85	54,87	57,98	56,62	57,53	58,52
% de 24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 24:1	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,09	0,00
% de grasa	46,83	46,10	31,23	47,39	49,78	30,62	54,71	37,72	37,87
% de desconocido	0,85	0,46	0,35	0,51	0,51	0,36	0,50	0,38	0,39

Acidos grasos	ATCC PTA-9695 de control	Mutante 1	Mutante 2	Mutante 3	Mutante 4	Mutante 5	Mutante 8	Mutante 9	Mutante 10
% de 18:3 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 18:4 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:0	0,39	0,36	0,42	0,45	0,34	0,46	0,37	0,40	0,40
% de 20:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:3 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:3 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:3 n-3	0,37	0,38	0,32	0,42	0,44	0,32	0,41	0,33	0,36
% de 20:4 ARA	0,55	0,55	0,94	0,57	0,80	0,99	0,60	0,73	0,75
% de 20:5 n-3 EPA	2,62	2,94	3,01	2,40	3,64	2,83	2,54	2,81	2,81
% de 22:0	0,08	0,08	0,09	0,09	0,07	0,10	0,07	0,09	0,09
% de 22:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 22:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 22:3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 22:4 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 22:5 n-6	319	3,19	2,94	3,43	3,35	2,87	3,34	3,01	3,15
% de 22:5 n-3	0,18	0,18	0,21	0,23	0,20	0,18	0,20	0,17	0,18
% de 22:6 n-3 DHA	56,88	58,63	57,56	57,85	54,87	57,98	56,62	57,53	58,52
% de 24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 24:1	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,09	0,00
% de grasa	46,83	46,10	31,23	47,39	49,78	30,62	54,71	37,72	37,87
% de desconocido	0,85	0,46	0,35	0,51	0,51	0,36	0,50	0,38	0,39

Tabla 23: Mutantes de la cepa de traustoitridio N° de acceso ATCC PTA-9695

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

Ácidos grasos	ATCC PTA-9695 de control	Mutante 11	Mutante 13	Mutante 14	Mutante 15	Mutante 16	Mutante 20	Mutante 21	Mutante 22
% de 18:3 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 18:4 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:0	0,39	0,38	0,42	0,39	0,40	0,37	0,37	0,38	0,38
% de 20:1 n-9	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:3 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:3 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:3 n-3	0,37	0,43	0,36	0,33	0,36	0,37	0,33	0,35	0,34
% de 20:4 ARA	0,55	0,79	0,72	0,80	0,64	0,62	0,83	0,73	0,69
% de 20:5 n-3 EPA	2,62	3,17	2,72	2,97	2,52	2,66	3,03	2,90	2,87
% de 22:0	0,08	0,08	0,09	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
% de 22:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 22:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 22:3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 22:4 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 22:5 n-6	3,19	3,25	3,06	2,97	3,07	3,16	2,98	3,01	3,02
% de 22:5 n-3	0,18	0,20	0,19	0,17	0,19	0,16	0,17	0,18	0,18
% de 22:6 n-3 DHA	56,88	55,17	57,52	57,63	56,02	57,38	58,58	57,45	56,65
% de 24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 24:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,00	0,00	0,08
% de grasa	46,83	46,19	37,00	38,41	48,46	47,32	37,71	40,23	43,55
% de desconocido	0,85	0,47	0,39	0,36	0,47	0,44	0,37	0,39	0,38

Tabla 24: Mutantes de la cepa de trausotquiridido N° de acceso ATCC PTA-9695

Ácidos grasos	ATCC PTA-9695 de control	Mutante 24	Mutante 26	Mutante 27	Mutante 29	Mutante 30	Mutante 33	Mutante 34	Mutante 35
% de 08:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 09:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 10:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 11:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 11:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 12:0	0,10	0,11	0,09	0,09	0,08	0,08	0,10	0,11	0,09
% de 12:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 13:0	0,11	0,12	0,13	0,14	0,16	0,14	0,12	0,12	0,10
% de 13:1	0,60	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 14:0	1,79	1,98	1,71	1,69	1,63	1,66	1,93	2,01	1,59
% de 14:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 15:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,70	0,54	0,39
% de 16:0	30,98	30,61	30,32	30,21	29,70	29,50	30,26	32,28	30,78
% de 16:1	0,27	0,19	0,22	0,22	0,26	0,26	0,29	0,26	0,16
% de 16:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 16:3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 17:0	0,12	0,15	0,18	0,16	0,13	0,13	0,26	0,16	0,12
% de 18:0	1,29	1,24	1,31	1,31	1,32	1,30	1,32	1,37	1,34
% de 18:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,11	0,09
% de 18:1 n-7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 18:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 18:3 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Ácidos grasos	ATCC PTA-9695 de control	Mutante 24	Mutante 26	Mutante 27	Mutante 29	Mutante 30	Mutante 33	Mutante 34	Mutante 35
% de 18:3 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 18:4 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:0	0,39	0,37	0,39	0,40	0,40	0,39	0,37	0,40	0,40
% de 20:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,14
% de 20:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:3 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:3 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:3 n-3	0,37	0,38	0,37	0,35	0,35	0,35	0,00	0,00	0,00
% de 20:4 ARA	0,55	0,11	0,59	0,69	0,68	0,32	0,34	0,24	0,28
% de 20:5 n-3 EPA	2,62	2,62	2,70	2,85	2,90	2,91	3,28	2,51	2,59
% de 22:0	0,08	0,08	0,08	0,08	0,09	0,08	0,08	0,08	0,08
% de 22:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 22:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 22:3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 22:4 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 22:5 n-6	3,19	3,10	3,11	3,05	3,10	3,11	3,43	3,26	3,56
% de 22:5 n-3	0,18	0,16	0,18	0,19	0,18	0,18	0,18	0,15	0,24
% de 22:6 n-3 DHA	56,88	57,03	57,46	57,46	57,96	58,52	55,92	54,96	56,73
% de 24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 24:1	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,07	0,07
% de grasa	46,83	47,80	43,50	38,86	38,60	38,16	46,95	46,43	51,55
% de desconocido	0,85	0,45	0,42	0,39	0,37	0,82	1,25	1,23	1,25

Tabla 25: Mutantes de la cepa de traustoquitridio N^o de acceso ATCC PTA-9695

Ácidos grasos	ATCC PTA-9695 de control	Mutante 36	Mutante 37	Mutante 38	Mutante 39	Mutante 40	Mutante 42	Mutante 43	Mutante 44
% de 08:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 09:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 10:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 11:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 11:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 12:0	0,10	0,00	0,11	0,00	0,11	0,09	0,08	0,12	0,09
% de 12:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 13:0	0,11	0,44	0,09	0,24	0,12	0,11	0,12	0,08	0,15
% de 13:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 14:0	1,79	1,25	1,99	1,48	1,96	1,76	1,43	2,17	1,75
% de 14:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 15:1	0,00	2,12	0,48	0,71	0,54	0,55	0,36	0,62	0,50
% de 16:0	30,98	26,95	28,04	32,28	30,84	30,25	25,77	43,37	30,18
% de 16:1	0,27	0,00	0,26	0,23	0,22	0,21	0,10	1,05	0,22
% de 16:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 16:3	0,00	0,00	0,00	0,66	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 17:0	0,12	0,95	0,13	0,28	0,16	0,16	0,10	0,26	0,13
% de 18:0	1,29	1,58	1,11	1,79	1,30	1,29	1,25	2,21	1,34
% de 18:1 n-9	0,00	0,37	0,08	0,25	0,09	0,09	0,12	0,09	0,10
% de 18:1 n-7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00
% de 18:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 18:3 n-6	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Ácidos grasos	A TCC PTA-9695 de control	Mutante 36	Mutante 37	Mutante 38	Mutante 39	Mutante 40	Mutante 42	Mutante 43	Mutante 44
% de 18:3 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 18:4 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:0	0,39	0,34	0,31	0,43	0,38	0,39	0,36	0,61	0,40
% de 20:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,43	0,00	0,14	0,15	0,15	0,49
% de 20:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:3 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:3 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:3 n-3	0,37	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:4 AFA	0,55	0,41	0,31	0,24	0,27	0,24	0,30	0,35	0,23
% de 20:5 n-3 EPA	2,62	5,36	2,77	4,00	2,72	2,80	3,21	3,47	2,80
% de 22:0	0,08	0,00	0,07	0,14	0,07	0,08	0,07	0,14	0,08
% de 22:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 22:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 22:3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 22:4 n-6	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 22:5 n-6	3,19	2,40	3,94	2,57	3,48	3,29	3,89	2,37	3,33
% de 22:5 n-3	0,18	0,00	0,19	0,00	0,17	0,17	0,30	0,33	0,17
% de 22:6 n-3 DHA	56,88	57,52	58,57	54,20	56,24	57,09	60,99	41,61	56,76
% de 24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 24:1	0,00	0,00	0,08	0,00	0,08	0,09	0,08	0,06	0,09
% de grasa	46,83	12,73	54,86	18,08	45,74	42,59	42,48	56,44	41,20
% de desconocido	0,85	0,29	1,36	0,73	1,28	1,20	1,31	0,90	1,20

Tabla 26: Mutantes de la cepa de traustoquiridio N° de acceso ATCC PTA-9695

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

Ácidos grasos	ATCC PTA-9695 de control	Mutante 45	Mutante 46	Mutante 47	Mutante 48	Mutante 49	Mutante 50	Mutante 51	Mutante 52
% de 18:3 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 18:4 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:0	0,39	0,36	0,29	0,37	0,42	0,42	0,39	0,40	0,41
% de 20:1 n-9	0,00	0,15	0,13	0,11	0,24	0,13	0,19	0,16	0,19
% de 20:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:3 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:3 n-6	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:3 n-3	0,37	0,00	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:4 ARA	0,55	0,29	0,65	0,26	0,18	0,21	0,22	0,24	0,24
% de 20:5 n-3 EPA	2,62	3,05	4,28	2,66	2,93	2,46	2,71	2,94	2,44
% de 22:0	0,08	0,07	0,06	0,07	0,09	0,09	0,08	0,08	0,08
% de 22:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 22:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 22:3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 22:4 n-6	0,00	0,06	0,07	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 22:5 n-6	3,19	3,59	4,28	3,46	3,07	3,32	3,17	3,18	3,24
% de 22:5 n-3	0,18	0,25	0,27	0,18	0,17	0,17	0,16	0,17	0,17
% de 22:6 n-3 DHA	56,88	57,74	58,32	56,70	58,65	56,45	56,83	56,19	55,06
% de 24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 24:1	0,00	0,07	0,15	0,10	0,10	0,11	0,10	0,10	0,07
% de grasa	46,83	48,91	58,95	54,80	35,41	48,60	44,93	43,01	51,93
% de desconocido	0,85	1,55	1,63	1,57	1,09	1,35	1,31	1,28	1,19

Tabla 27: Mutantes de la cepa de traustoitridio N^o de acceso ATCC PTA-9695

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

Ácidos grasos	ATCC PTA 9695 de control	Mutante 53	Mutante 54	Mutante 55	Mutante 56	Mutante 57	Mutante 58	Mutante 60	Mutante 61	Mutante 65
% de 18:3 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 18:4 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:0	0,39	0,38	0,39	0,40	0,42	0,38	0,43	0,39	0,39	0,41
% de 20:1 n-9	0,00	0,19	0,16	0,13	0,19	0,20	0,17	0,14	0,13	0,21
% de 20:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:3 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:3 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:3 n-3	0,37	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:4 ARA	0,55	0,25	0,21	0,26	0,22	0,25	0,51	0,20	0,24	0,19
% de 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
% de 22:0	0,08	0,08	0,08	0,08	0,09	0,08	0,09	0,08	0,08	0,09
% de 22:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 22:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 22:3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 22:4 n-6,	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00
% de 22:5 n-6	3,19	3,47	3,20	3,25	3,19	3,43	2,62	3,30	3,42	3,18
% de 22:5 n-3	0,18	0,18	0,18	0,17	0,17	0,20	0,59	0,17	0,17	0,17
% de 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
% de 24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 24:1	0,00	0,08	0,09	0,07	0,10	0,09	0,11	0,10	0,07	0,08
% de grasa	46,83	45,83	39,59	48,81	41,92	43,97	33,96	36,87	50,40	36,21
% de desconocido	0,85	1,28	1,19	1,19	1,29	1,35	0,77	1,24	1,48	1,17

Tabla 28: Mutantes de la cepa de traustoquiridio N^o de acceso ATCC PTA-9695

Ácidos grasos	ATCC PTA-9695 de control	Mutante 66	Mutante 67	ATCC PTA-9696 Mutante 68	Mutante 69	ATCC PTA-9697 Mutante 70	Mutante 71	ATCC PTA-9698 Mutante 72	Mutante 73	Mutante 74
% de 08:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 09:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 10:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 11:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 11:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 12:0	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00
% de 12:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 13:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 13:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,22	0,00	0,00	0,00
% de 14:0	2,42	2,29	2,07	2,09	2,11	2,21	2,27	2,29	1,97	2,05
% de 14:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,19	0,00	0,00	0,00
% de 15:1	0,55	0,47	0,48	0,47	0,47	0,44	0,46	0,40	0,50	0,47
% de 16:0	39,19	31,02	26,20	25,84	27,79	28,14	28,89	33,49	24,50	23,95
% de 16:1	0,43	0,19	0,00	0,00	0,00	0,00	0,19	0,21	0,00	0,00
% de 16:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 16:3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 17:0	0,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00
% de 18:0	1,67	1,68	1,22	1,22	1,44	1,49	1,51	2,24	1,11	1,02
% de 18:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 18:1 n-7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 18:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 18:3 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Ácidos grasos	ATCC PTA-9695 de control	Mutante 66	Mutante 67	ATCC PTA-9696 Mutante 68	Mutante 69	ATCC PTA-9697 Mutante 70	Mutante 71	ATCC PTA-9698 Mutante 72	Mutante 73	Mutante 74
% de 18:3 n-3	0,00	0,18	0,20	0,21	0,19	0,17	0,22	0,16	0,22	0,22
% de 18:4 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:0	0,49	0,41	0,32	0,31	0,35	0,37	0,44	0,52	0,29	0,27
% de 20:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:3 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:3 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:3 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:4 ARA	0,18	0,16	0,33	0,27	0,24	0,37	0,30	0,27	0,38	0,39
% de 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
% de 22:0	0,33	0,46	0,35	0,44	0,48	0,38	0,43	0,12	0,35	0,34
% de 22:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 22:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 22:3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 22:4 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 22:5 n-6	2,62	2,83	3,17	2,66	2,72	2,95	3,46	2,79	3,17	3,19
% de 22:5 n-3	0,18	0,18	0,46	0,42	0,34	0,61	0,25	0,27	0,48	0,57
% de 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
% de 24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 24:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% de grasa	52,70	49,32	48,51	49,49	48,80	53,65	40,38	63,40	48,27	46,63
% de desconocido	0,35	0,82	0,73	0,66	0,67	0,73	2,46	1,18	0,78	0,76

Ejemplo 34**Aislamiento de microorganismos**

Se recogieron muestras de hábitats de debajo de las mareas durante la marea baja, que incluyen bahías y estuarios a lo largo de la costa oeste de América del Norte (California, Oregón y Washington) y Hawái. Se dispusieron agua, sedimento, material vegetal vivo y residuos vegetales/animales en descomposición en tubo estériles de 50 mL. Se extendieron porciones de cada muestra junto con el agua sobre placas de agar sólido de medio de aislamiento. El medio de aislamiento consistió 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 de 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 B₁₂), 1 mL de una disolución de oligominerales (metales PII, que contienen por litro: 6,0 g de FeCl₃6H₂O, 6,84 g de H₃BO₃, 0,86 g de MnCl₂4H₂O, 0,06 g de ZnCl₂, 0,026 de CoCl₂6H₂O, 0,052 g de NiSO₄H₂O, 0,002 g de CuSO₄5H₂O y 0,005 g de Na₂MoO₄2H₂O), y 500 mg de cada uno de penicilina G y sulfato de estreptomicina. Se incubaron en la oscuridad las placas de agar a 20-25 °C. Después de 2-4 días, se examinaron las placas de agar con aumento, y se seleccionaron colonias de células con un palillo estéril y se volvieron a extender sobre una placa nueva de medio. Se extendieron repetidamente las células sobre medio nuevo hasta que se retiraron los organismos contaminados. Dos de los microorganismos aislados se depositaron con los N^o de acceso ATCC PTA-10212 y PTA-10208.

Características taxonómicas del microorganismo aislado depositado con el N^o de acceso ATCC PTA-10212

Cultivos del microorganismo aislado depositado con el N^o de acceso ATCC PTA-10212 ("PTA-10212") aparecieron como colonias manchadas húmedas blancas sin soros aislados visibles.

Se cultivó PTA-10212 sobre FFM sólido y líquido, KMV sólido, aguanieve de KMV (1 %), caldo KMV y caldo MH para examinar adicionalmente las características de crecimiento. Se observó que PTA-10212 creía rápidamente sobre KMV y MH. Véase, por ejemplo, Porter D., 1989. Phylum Labyrinthulomycota. En Margulis, L., Corliss, J.O., Melkonian, M., Chapman, D.J. (Eds.) Handbook of Protoctista, Jones and Bartlett, Boston, pp. 388-398 (KMV); Honda et al., Mycol. Res. 102:439-448 (1998) (MH); y patente de EE. UU. N^o 5.130.242 (FFM).

Se hicieron las siguientes observaciones después de crecimiento de PTA-10212 durante varios días sobre medio FFM sólido, después de 72 horas crecimiento en medio KMV, y caldo MH. No se agruparon esporangios en/sobre ningún medio y fueron muy pequeños (5-10 µm). PTA-10212 no demostró las copiosas tétradas características de los patrones de escisión de *Schizochytrium*. Aparecieron células ameboides aproximadamente 24 horas después de la transferencia a medio sólido nuevo. Estas células ameboides desaparecieron después de algunos días y no fueron evidentes en medios líquidos o de aguanieve. A diferencia de *Aurantiochytrium*, descrito por Yokoyama, R. et al., Mycoscience 48(6): 329-341 (2007), por tener el aspecto de "pequeños granos de arena sobre el fondo del matraz" cuando crecieron en medios líquidos, PTA-10212 no sedimentó en el fondo del matraz, pero se suspendió en tanto medios líquidos KMV como MH. Los esporangios no fueron tan densos como los típicos de *Schizochytrium* u *Oligochytrium*, que también tienen robustas redes ectoplásmicas que estuvieron ausentes de PTA-10212. Mientras que la mayoría de las especies experimentaron escisión vegetativa de pequeños esporangios o células asimilativas por la división de un gran esporangio durante varias horas, PTA-10212 formó células asimilativas alargadas en forma de mancuerna, que luego formaron un delgado istmo que se separó a medida que se separaron los extremos de la mancuerna. Pareció que las células resultantes eran pequeñas células asimilativas. No se observó la transformación directa de una célula amebode en la célula asimilativa en forma de mancuerna. Se observaron las zoosporas biflageladas típicas nadando, pero fueron relativamente raras. PTA-10212 fue no prolífica, dividiéndose por escisión vegetativa. No se observó liberación directa de zoosporas, aunque se observaron zoosporas nadando. Las células vegetativas fueron muy pequeñas (2 µm a 5 µm).

Se examinó además PTA-10212 usando la técnica de flujo continuo, en la que se prepararon portaobjetos microscópicos suspendiendo una pequeña porción de una colonia cultivada en agar en una gota de agua de mar semiconcentrada. Con esta técnica, se observaron esporangios primarios que eran globosos y aproximadamente 10 µm de diámetro. Las paredes fueron muy finas y no se observaron residuos cuando se inició la división binaria del protoplasto. La división binaria repetida produjo 8-16 esporangios secundarios más pequeños (4-5 µm de diámetro). Los esporangios secundarios siguieron quiescentes durante varios horas antes de liberar nuevamente un protoplasto amorfo. El protoplasto amorfo se dividió por pellizcado y estiramiento, produciendo inicialmente etapas intermedias típicas en forma de mancuerna y resultando finalmente en 4-8 cuerpos globosos pequeños de 2,5-2,8 µm de diámetro. Los últimos descansaron durante varios minutos hasta 1-2 horas, luego cambiaron de forma (alargada) y se convirtieron zoosporas biflageladas, 2,3-2,5 x 3,7-3,9 µm. Las zoosporas fueron abundantes y pudieron ser medidas con precisión cuando reposaron. Las zoosporas se redondearon y empezaron un nuevo ciclo de desarrollo. Las zoosporas fueron más grandes que *Sicyoidochytrium minutum* y más pequeños que *Ulkenia visurgensis*.

Se caracterizó adicionalmente PTA-10212 basándose en la similitud de su gen ARNr 18s con el de las especies conocidas. Se preparó ADN genómico a partir de PTA-10212 mediante procedimientos convencionales. Véase, por ejemplo, Sambrook J. y Russell D. 2001. Molecular cloning: A laboratory manual, 3^a edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. Brevemente: (1) se centrifugaron 500 µL de células de cultivo semilogarítmico. Se volvieron a centrifugar las células, y se retiraron todas las trazas de líquido del sedimento de

células con una punta con orificio pequeño; (2) se resuspendieron los sedimentos con 200 μ L de tampón de lisis (Tris 20 mM a pH 8,0, 125 μ g/mL de proteinasa K, NaCl 50 mM, EDTA 10 mM a pH 8,0, 0,5 % de SDS); (3) se lisaron las células a 50 °C durante 1 hora; (4) se pipeteó la mezcla de lisis en tubos de 2 mL de gel de bloqueo de fase (PLG-Eppendorf); (5) se añadió volumen igual de P:C:1 y se dejó mezclar durante 1,5 horas; (6) los tubos se centrifugaron a 12.000 x g durante 5 minutos; (7) se retiró la fase acuosa del gel anterior dentro del tubo de PLG y se añadió un volumen igual de cloroformo a la fase acuosa, y se mezcló durante 30 minutos; (8) se centrifugaron los tubos a 14.000 x g durante aproximadamente 5 minutos; (9) se pipeteó la capa superior (fase acuosa) del cloroformo, y se dispuso en un nuevo tubo; (10) se añadieron 0,1 volúmenes de NaOAC 3 M y se mezclaron (se invirtieron varias veces); (11) se añadieron 2 volúmenes de 100 % de EtOH y se mezclaron (se invirtieron varias veces) con precipitante de ADN genómico que se forma en esta etapa; (12) se centrifugaron los tubos a 4 °C en una microcentrifugadora a 14.000 x g durante aproximadamente 15 minutos; (13) se vertió suavemente el líquido quedando el ADN genómico en el fondo del tubo; (14) se lavó el sedimento con 0,5 mL de 70 % de EtOH; (15) se centrifugaron los tubos a 4°C en una microcentrifugadora a 14.000 x g durante aproximadamente 5 minutos; (16) se vertió suavemente el EtOH y se secó el sedimento de ADN genómico; y (17) se añadió un volumen adecuado de H₂O y RNasa directamente al sedimento de ADN genómico. La amplificación por PCR del gen ARNr 18s se llevó a cabo con cebadores previamente descritos (Honda et. al., J Euk Micro. 46(6): 637-647 (1999). Las condiciones de PCR con molde de ADN cromosómico fueron del siguiente modo: dNTPs 0,2 uM, 0,1 μ M de cada cebador, 8 % de DMSO, 200 ng de ADN cromosómico, 2,5 U de ADN Polimerasa Herculase® II Fusion (Stratagene), y tampón Herculase® (Stratagene) en un volumen total de 50 μ L. El protocolo de PCR incluyó las siguientes etapas: (1) 95 °C durante 2 minutos; (2) 95 °C durante 35 segundos; (3) 55 °C durante 35 segundos; (4) 72 °C durante 1 minuto y 30 segundos; (5) repetir las etapas 2-4 durante 30 ciclos; (6) 72 °C durante 5 minutos; y (7) mantener a 4 °C.

La amplificación por PCR dio un producto de ADN distinto con el tamaño esperado usando el molde cromosómico descrito anteriormente. Se clonó el producto de PCR en el vector pJET1.2/blunt (Fermentas) según las instrucciones del fabricante, y se determinó la secuencia de inserción usando cebadores estándar suministrados.

El análisis filogenético pone PTA-10212 dentro del linaje que incluye *Thraustochytrium pachydermus* y *Thraustochytrium aggregatum* con soporte moderado. Los esporangios de *T. pachydermus* tienen paredes celulares muy gruesas. *T. aggregatum* forma grumos claramente visibles de soros que son opacos. PTA-10212 no muestra ninguna de estas características. Se ha descrito la presencia de muchas células ameboides en otros taxos, tales como *Ulkenia*, *T. gaertnerium*, *A. limiacinum* y *S. mangrovei*; sin embargo, las descripciones asociadas a los taxos se diferencian de las características observadas de la cepa aislada. Además, PTA-10212 no mostró afinidad filogenética hacia ninguno de estos taxos.

La Tabla 29 muestra una comparación de la secuencia de ARNr 18s del microorganismo depositado con N° de acceso ATCC PTA-10212 con secuencias de ADN en la base de datos electrónica del Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI). El porcentaje de identidad se determinó usando dos cálculos diferentes. "Cálculo N° 1" tiene en cuenta cualquier "hueco" que ocurra en las secuencias, ya sea de regiones no homólogas o secuencia parcial (parámetros por defecto AlignX-VectorNTI). "Cálculo N° 2" no incluye penalizaciones calculadas para huecos (establecimiento de matriz "IDENTITY" de AlignX-VectorNTI).

Tabla 29: Comparación de secuencias de ARNr 18s

Traustoquitridios	% de identidad Cálculo N° 1	% de identidad Cálculo N° 2
<i>Thraustochytrium pachydermus</i>	85 %	93 %
<i>Thraustochytrium aggregatum</i> (p)	83 %	92 %
<i>Thraustochytrium gaertnerium</i>	82 %	92 %
<i>Ulkenia visurgensis</i>	82 %	92 %
<i>Schizochytrium</i> sp. PTA-9695	80 %	92 %
<i>Schizochytrium mangrovei</i>	80 %	91 %
<i>Schizochytrium</i> sp. ATCC 20888	80 %	90 %
<i>Aurantiochytrium limiacinum</i>	79 %	90 %
(p): indica secuencia parcial		

Como se muestra en la Tabla 29, se encontró que, en términos de % de identidad, la secuencia del gen ARNr 18s del microorganismo depositado con N° de acceso ATCC PTA-10212 está relacionada con, aunque no es idéntica a, secuencias del gen ARNr 18s disponibles en la base de datos NCBI. En general, se reconoce que los organismos

pueden tener secuencias del gen ARNr 18s estrechamente relacionadas, mientras que pertenecen a un género o especie diferente.

Basándose en la caracterización anterior, se cree que el microorganismo aislado (Nº de acceso ATCC PTA-10212) representar una nueva especie de *Thraustochytrium* y, por tanto, también se designa *Thraustochytrium* sp. ATCC PTA-10212.

Características taxonómicas del microorganismo aislado depositado con Nº de acceso ATCC PTA-10208

Se identificó el microorganismo depositado con Nº de acceso ATCC PTA-10208 ("PTA-10208") como una subcepa aislada (una célula individual aislada de un cultivo y mantenida como un nuevo cultivo separado y distinto) del microorganismo depositado con Nº de acceso ATCC PTA-9695 ("PTA-9695"), descrito en la publicación de EE. UU. Nº 2010/0239533 y la publicación internacional Nº WO 2010/107415.

PTA-10208 comparte características taxonómicas con PTA-9695. PTA-9695 se encontró que tenía zoosporas biflageladas en la descarga que nadan activamente lejos del esporangio maduro, cuyos restos de pared fueron claramente visibles (en contraste de fase) después de la liberación de esporas. Los esporangios de PTA-9695 midieron 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 de PTA-9695. Las zoosporas de PTA-9695 sedimentadas se extendieron y rápidamente experimentaron divisiones binarias que conducen a tétradas, óctadas, y finalmente a agrupaciones de esporangios. La formación de tétradas comenzó en una etapa muy temprana antes de la madurez de los esporangios. Estas características están de acuerdo con el género *Schizochytrium*. En términos de % de identidad, se encontró que la secuencia del gen ARNr 18s de PTA-9695, que es compartida por PTA-10208, estaba estrechamente relacionada, aunque no sea idéntica, a la secuencia del gen ARNr 18s de *T. aggregatum* proporcionada en Honda, D. et al., J. Euk Micro. 46(6): 637-647 (1999). La de secuencia ARNr 18s publicada para *Thraustochytrium aggregatum* es una secuencia parcial, con un hueco de aproximadamente 71 nucleótidos de ADN en el centro de la secuencia. Se cree que PTA-9695 representar una nueva especie de *Schizochytrium*. Como tal, la subcepa aislada PTA-10208 también se designa *Schizochytrium* sp. ATCC PTA-10208.

Ejemplo 35

Características de crecimiento del microorganismo aislado depositado con Nº de acceso ATCC PTA-10212

Se examinó el microorganismo aislado (Nº de acceso ATCC PTA-10212) para las características de crecimiento en series individuales de fermentación, como se describe a continuación. Se muestran medios típicos y condiciones de cultivo en la Tabla 30.

Tabla 30: Medio del recipiente de PTA-10212

<u>Ingrediente</u>	<u>concentración</u>	<u>intervalos</u>
Na ₂ SO ₄	g/L	31,0 0-50, 15-45, o 25-35
NaCl	g/L	0,625 0-25, 0,1-10, o 0,5-5
KCl	g/L	1,0 0-5, 0,25-3, o 0,5-2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	g/L	5,0 0-10, 2-8, o 3-6
(NH ₄) ₂ SO ₄	g/L	0,44 0-10, 0,25-5, o 0,05-3
MSG·1H ₂ O	g/L	6,0 0-10, 4-8, o 5-7
CaCl ₂	g/L	0,29 0,1-5, 0,15-3, o 0,2-1
T 154 (extracto de levadura)	g/L	6,0 0-20, 0,1-10, o 1-7
KH ₂ PO ₄	g/L	0,8 0,1-10, 0,5-5, o 0,6-1,8
<u>Post-autoclave (Metales)</u>		
Ácido cítrico	mg/L	3,5 0,1-5000, 10-3000, o 3-2500
FeSO ₄ ·7H ₂ O	mg/L	10,30 0,1-100, 1-50, o 5-25
MnCl ₂ ·4H ₂ O	mg/L	3,10 0,1-100, 1-50, o 2-25

ES 2 758 782 T3

ZnSO ₄ ·7H ₂ O	mg/L	3,10	0,01-100, 1-50, o 2-25
CoCl ₂ ·6H ₂ O	mg/L	0,04	0-1, 0,001-0,1, o 0,01-0,1
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	mg/L	0,04	0,001-1, 0,005-0,5, o 0,01-0,1
CuSO ₄ ·5H ₂ O	mg/L	2,07	0,1-100, 0,5-50, o 1-25
NiSO ₄ ·6H ₂ O	mg/L	2,07	0,1-100, 0,5-50, o 1-25

Post-autoclave (Vitaminas)

Tiamina	mg/L	9,75	0,1-100, 1-50, o 5-25
Vitamina B12	mg/L	0,16	0,01-100, 0,05-5, o 0,1-1
½-Pantotenato de Ca	mg/L	2,06	0,1-100, 0,1-50, o 1-10
Biotina	mg/L	3,21	0,1-100, 0,1-50, o 1-10

Post-autoclave (Carbono)

Glicerol	g/L	30,0	5-150, 10-100, o 20-50
----------	-----	------	------------------------

Alimentación de nitrógeno:

<u>Ingrediente</u>	<u>Concentración</u>		
MSG·1H ₂ O	g/L	17	0-150, 10-100, o 15-50

Condiciones de cultivo típicas incluirían las siguientes:

pH	aproximadamente 6,5 - aproximadamente 9,5, aproximadamente 6,5 - aproximadamente 8,0, o aproximadamente 6,8 - aproximadamente 7,8;
temperatura:	aproximadamente 15 - aproximadamente 30 grados Celsius, aproximadamente 18 - aproximadamente 28 grados Celsius, o aproximadamente 21 a aproximadamente 23 grados Celsius;
oxígeno disuelto:	aproximadamente 0,1 - aproximadamente 100 % de saturación, aproximadamente 5 - aproximadamente 50 % de saturación, o aproximadamente 10 - aproximadamente 30 % de saturación; y/o
glucosa controlada a:	aproximadamente 5 - aproximadamente 50 g/L, aproximadamente 10 - aproximadamente 40 g/L, o aproximadamente 15 - aproximadamente 35 g/L.

5 En cultivos alimentados con carbono (glicerol) y nitrógeno con 1000 ppm de Cl⁻ a 22,5 °C con 20 % de oxígeno disuelto a pH 7,3, PTA-10212 produjo un peso de células secas de 26,2 g/L después de 138 horas de cultivo en un volumen de fermentador de 10 L. El rendimiento de lípidos fue 7,9 g/L; el rendimiento de omega-3 fue 5,3 g/L; el rendimiento de EPA fue 3,3 g/L; y el rendimiento de DHA fue 1,8 g/L. El contenido de ácidos grasos fue 30,3 % en peso; el contenido de EPA fue 41,4 % de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME); y el contenido de DHA fue 26,2 % de FAME. La productividad de lípidos fue 1,38 g/L/día, y la productividad de omega-3 fue 0,92 g/L/día en estas condiciones, con 0,57 g/L/día de productividad de EPA y 0,31 g/L/día de productividad de DHA.

10 En cultivos alimentados con carbono (glicerol) y nitrógeno con 1000 ppm de Cl⁻ a 22,5 °C con 20 % de oxígeno disuelto a pH 7,3, PTA-10212 produjo un peso de células secas de 38,4 g/L después de 189 horas de cultivo en un volumen de fermentador de 10 L. El rendimiento de lípidos fue 18 g/L; el rendimiento de omega-3 fue 12 g/L; el rendimiento de EPA fue 5 g/L; y el rendimiento de DHA fue 6,8 g/L. El contenido de ácidos grasos fue 45 % en peso; el contenido de EPA fue 27,8 % de FAME; y el contenido de DHA fue 37,9 % de FAME. La productividad de lípidos fue 2,3 g/L/día, y la productividad de omega-3 fue 1,5 g/L/día en estas condiciones, con 0,63 g/L/día de productividad de EPA y 0,86 g/L/día de productividad de DHA.

15

5 En cultivos alimentados con carbono (glicerol) y nitrógeno con 1000 ppm de Cl⁻ a 22,5 °C con 20 % de oxígeno disuelto a pH 6,8-7,7, PTA-10212 produjo un peso de células secas de 13 g/L después de 189 horas de cultivo en un volumen de fermentador de 10 L. El rendimiento de lípidos fue 5,6 g/L; el rendimiento de omega-3 fue 3,5 g/L; el rendimiento de EPA fue 1,55 g/L; y el rendimiento de DHA fue 1,9 g/L. El contenido de ácidos grasos fue 38 % en peso; el contenido de EPA fue 29,5 % de FAME; y el contenido de DHA fue 36 % de FAME. La productividad de lípidos fue 0,67 g/L/día, y la productividad de omega-3 fue 0,4 g/L/día en estas condiciones, con 0,20 g/L/día de productividad de EPA y 0,24 g/L/día de productividad de DHA.

10 En cultivos alimentados con carbono (glicerol) y nitrógeno con 1000 ppm de Cl⁻ a 22,5-28,5 °C con 20 % de oxígeno disuelto a pH 6,6-7,2, PTA-10212 produjo un peso de células secas de 36,7 g/L - 48,7 g/L después de 191 horas de cultivo en un volumen de fermentador de 10 L. El rendimiento de lípidos fue 15,2 g/L - 25,3 g/L; el rendimiento de omega-3 fue 9,3 g/L - 13,8 g/L; el rendimiento de EPA fue 2,5 g/L - 3,3 g/L; y el rendimiento de DHA fue 5,8 g/L - 11 g/L. El contenido de ácidos grasos fue 42,4 % - 53 % en peso; el contenido de EPA fue 9,8 % - 22 % de FAME; y el contenido de DHA fue 38,1 % - 43,6 % de FAME. La productividad de lípidos fue 1,9 g/L/día - 3,2 g/L/día, y la productividad de omega-3 fue 1,2 g/L/día - 1,7 g/L/día en estas condiciones, con 0,31 g/L/día - 0,41 g/L/día de productividad de EPA y 0,72 g/L/día - 1,4 g/L/día de productividad de DHA.

Características de crecimiento del microorganismo aislado depositado con N° de acceso ATCC PTA-10208

Se examinó el microorganismo aislado (N° de acceso ATCC PTA-10208) para características de crecimiento en series individuales de fermentación, como se describe a continuación. Se muestran medios típicos y condiciones de cultivo en la Tabla 31.

20 Tabla 31: Medio del recipiente de PTA-10208

<u>Ingrediente</u>	<u>concentración</u>	<u>intervalos</u>
Na ₂ SO ₄	g/L 8,8	0-25, 2-20, o 3-10
NaCl	g/L 0,625	0-25, 0,1-10, o 0,5-5
KCl	g/L 1,0	0-5, 0,25-3, o 0,5-2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	g/L 5,0	0-10, 2-8, o 3-6
(NH ₄) ₂ SO ₄	g/L 0,42	0-10, 0,25-5, o 0,05-3
CaCl ₂	g/L 0,29	0,1-5, 0,15-3, o 0,2-1
T 154 (extracto de levadura)	g/L 1,0	0-20, 0,1-10, o 0,5-5
KH ₂ PO ₄	g/L 1,765	0,1-10, 0,5-5, o 1-3
<u>Post autoclave (Metales)</u>		
Ácido cítrico	mg/L 46,82	0,1-5000, 10-3000, o 40-2500
FeSO ₄ ·7H ₂ O	mg/L 10,30	0,1-100, 1-50, o 5-25
MnCl ₂ ·4H ₂ O	mg/L 3,10	0,1-100, 1-50, o 2-25
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	mg/L 9,3	0,01-100, 1-50, o 2-25
CoCl ₂ ·6H ₂ O	mg/L 0,04	0-1, 0,001-0,1, o 0,01-0,1
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	mg/L 0,04	0,001-1, 0,005-0,5, o 0,01-0,1
CuSO ₄ ·5H ₂ O	mg/L 2,07	0,1-100, 0,5-50, o 1-25
NiSO ₄ ·6H ₂ O	mg/L 2,07	0,1-100, 0,5-50, o 1-25
<u>Post autoclave (Vitaminas)</u>		
Tiamina	mg/L 9,75	0,1-100, 1-50, o 5-25
½-Pantotenato de calcio	mg/L 3,33	0,1-100, 0,1-50, o 1-10

ES 2 758 782 T3

Biotina	mg/L	3,58	0,1-100, 0,1-50, o 1-10
---------	------	------	-------------------------

Post-autoclave (Carbono)

Glucosa	g/L	30,0	5-150, 10-100, o 20-50
---------	-----	------	------------------------

Alimentación de nitrógeno:

<u>Ingrediente</u>		<u>Concentración</u>	
NH ₄ OH	mL/L	23,6	0-150, 10-100, o 15-50

Condiciones típicas de cultivo incluirían las siguientes:

pH	aproximadamente 6,5 - aproximadamente 8,5, aproximadamente 6,5 - aproximadamente 8,0, o aproximadamente 7,0 - aproximadamente 8,0;
temperatura:	aproximadamente 17 - aproximadamente 30 grados Celsius, aproximadamente 20 - aproximadamente 28 grados Celsius, o aproximadamente 22 a aproximadamente 24 grados Celsius;
oxígeno disuelto:	aproximadamente 2 - aproximadamente 100 % de saturación, aproximadamente 5 - aproximadamente 50 % de saturación, o aproximadamente 7 - aproximadamente 20 % de saturación; y/o
glucosa controlada a:	aproximadamente 5 - aproximadamente 50 g/L, aproximadamente 10 - aproximadamente 40 g/L, o aproximadamente 20 - aproximadamente 35 g/L.

- En cultivos alimentados con carbono (glucosa) y nitrógeno con 1000 ppm de Cl⁻ a 22,5 °C a pH 7,0 con 20 % de oxígeno disuelto durante la alimentación de nitrógeno y 10 % de oxígeno disuelto a partir de aquí, PTA-10208 produjo un peso de células secas de 95 g/L después de 200 horas de cultivo en un volumen de fermentador de 10 L.
- 5 El rendimiento de lípidos fue 53,7 g/L; el rendimiento de omega-3 fue 37 g/L; el rendimiento de EPA fue 14,3 g/L; y el rendimiento de DHA fue 21 g/L. El contenido de ácidos grasos fue 57 % en peso; el contenido de EPA fue 27,7 % de FAME; y el contenido de DHA fue 39,1 % de FAME. La productividad de lípidos fue 6,4 g/L/día, y la productividad de omega-3 fue 4,4 g/L/día en estas condiciones, con 1,7 g/L/día de productividad de EPA y 2,5 g/L/día de productividad de DHA.
- 10 En cultivos alimentados con carbono (glucosa) y nitrógeno con 1000 ppm de Cl⁻ a 22,5 °C a pH 7,5 con 20 % de oxígeno disuelto durante la alimentación de nitrógeno y 10 % de oxígeno disuelto a partir de aquí, PTA-10208 produjo un peso de células secas de 56 g/L después de 139 horas de cultivo en un volumen de fermentador de 10 L. El rendimiento de lípidos fue 53 g/L; el rendimiento de omega-3 fue 34 g/L; el rendimiento de EPA fue 11,5 g/L; y el rendimiento de DHA fue 22 g/L. El contenido de ácidos grasos fue 58 % en peso; el contenido de EPA fue 21,7 % de FAME; y el contenido de DHA fue 41,7 % de FAME. La productividad de lípidos fue 9,2 g/L/día, y la productividad de omega-3 fue 5,9 g/L/día en estas condiciones, con 2 g/L/día de productividad de EPA y 3,8 g/L/día de productividad de DHA.
- 15
- 20 En cultivos alimentados con carbono (glucosa) y nitrógeno con 1000 ppm de Cl⁻ a 22,5 °C a pH 7,0 con 20 % de oxígeno disuelto durante la alimentación de nitrógeno y 10 % de oxígeno disuelto a partir de aquí, PTA-10208 produjo un peso de células secas de 93,8 g/L después de 167 horas de cultivo en un volumen de fermentador de 2000 L. El rendimiento de lípidos fue 47,2 g/L; el rendimiento de omega-3 fue 33,1 g/L; el rendimiento de EPA fue 10,5 g/L; y el rendimiento de DHA fue 20,4 g/L. El contenido de ácidos grasos fue 50,6 % en peso; el contenido de EPA fue 23 % de FAME; y el contenido de DHA fue 42,6 % de FAME. La productividad de lípidos fue 6,8 g/L/día, y la productividad de omega-3 fue 4,7 g/L/día en estas condiciones, con 1,5 g/L/día de productividad de EPA y 2,9 g/L/día de productividad de DHA.
- 25
- En cultivos alimentados con carbono (glucosa) y nitrógeno con 1000 ppm de Cl⁻ a 22,5 °C a pH 7,0 con 20 % de oxígeno disuelto durante la alimentación de nitrógeno y 10 % de oxígeno disuelto a partir de aquí, PTA-10208 produjo un peso de células secas de 105 g/L después de 168 horas de cultivo en un volumen de fermentador de 2000 L. El rendimiento de lípidos fue 46,4 g/L; el rendimiento de omega-3 fue 33 g/L; el rendimiento de EPA fue 10,7 g/L; y el rendimiento de DHA fue 20,3 g/L. El contenido de ácidos grasos fue 43,9 % en peso; el contenido de EPA fue 24 % de FAME; y el contenido de DHA fue 43,7 % de FAME. La productividad de lípidos fue 6,6 g/L/día, y la productividad de omega-3 fue 4,7 g/L/día en estas condiciones, con 1,5 g/L/día de productividad de EPA y 2,9 g/L/día de productividad de DHA.
- 30

En cultivos alimentados con carbono (glucosa) y nitrógeno con 1000 ppm de Cl⁻ a 22,5 °C a pH 7,0 con 20 % de oxígeno disuelto durante la alimentación de nitrógeno y 10 % de oxígeno disuelto a partir de aquí, PTA-10208 produjo un peso de células secas de 64,8 g/L después de 168 horas de cultivo en un volumen de fermentador de 2000 L. El rendimiento de lípidos fue 38,7 g/L; el rendimiento de omega-3 fue 29,9 g/L; el rendimiento de EPA fue 8,5 g/L; y el rendimiento de DHA fue 16,7 g/L. El contenido de ácidos grasos fue 59,6 % en peso; el contenido de EPA fue 23 % de FAME; y el contenido de DHA fue 42,3 % de FAME. La productividad de lípidos fue 5,53 g/L/día, y la productividad de omega-3 fue 3,8 g/L/día en estas condiciones, con 1,2 g/L/día de productividad de EPA y 2,3 g/L/día de productividad de DHA.

Ejemplo 36

10 Perfiles de ácidos grasos de cepas de microorganismos ATCC PTA-10208 y PTA-10212

Se analizaron cuatro muestras de biomasa (Muestra N° 1 de PTA-10208; Muestra N° 2 de PTA-10208; Muestra N° 1 de PTA-10212; y Muestra N° 2 de PTA-10212) para contenido de aceite en bruto total por extracción con disolvente, se determinaron clases de lípido por cromatografía líquida de alta resolución/detección evaporativa de dispersión de la luz (HPLC/ELSD), se analizaron triacilglicerol (TAG) por HPLC/espectrometría de masas (HPEM/CL), y se determinaron perfiles de ácidos grasos (FA) por cromatografía de gases con detección de ionización de llama (GC-FID). Se determinó el contenido de lípido en bruto de cada biomasa liofilizada usando trituración del disolvente con hexano y en comparación con la suma de FAME (mg/g) generada por transesterificación directa, y se cuantificaron los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) resultantes por análisis de GC/FID. También se cuantificaron los ácidos grasos en el lípido en bruto extraído por transesterificación y se cuantificaron usando análisis de GC/FID de los FAMEs resultantes. Se determinó el porcentaje en peso de todos los lípidos neutros (NL) y ácidos grasos libres (FFA) en el lípido en bruto extraído usando HPLC de fase normal con ELSD e identificación por ionización química a presión atmosférica-EM (APCI-MS). El método separa y cuantifica ésteres de esteroles (SE), TAG, ácidos grasos libres (FFA), 1,3-diacilgliceroles (1,3-DAG), esteroides, 1,2-diacilgliceroles (1,2-DAG), y monoacilgliceroles (MAG). Los resultados se muestran en las Tablas 32 y 33, a continuación. Se observa que los perfiles de ácidos grasos de las Tablas 32 y 33 se obtuvieron de muestras extraídas usando un disolvente. Se espera que los perfiles de ácidos grasos de las Tablas 32 y 33 sean sustancialmente los mismos si las muestras se extrajeran usando los procesos de la presente invención.

Se aislaron TAG y fosfolípidos (PL) de los aceites en bruto extraídos de las cuatro muestras de biomasa (Muestra N° 1 de PTA-10208; Muestra N° 2 de PTA-10208; Muestra N° 1 de PTA-10212; y Muestra N° 2 de PTA-10212). Se aisló TAG usando cromatografía ultrarrápida de baja presión y se aisló PL usando extracción en fase sólida (SPE). Se confirmó la identidad de cada fracción aislada por cromatografía en capa fina (CCF). Se determinaron los perfiles de ácidos grasos de las fracciones aisladas de TAG y PL tras la transesterificación directa usando GC-FID como FAME. Los resultados se muestran en las Tablas 34 y 35, a continuación.

También se determinaron el contenido de aceite en bruto total y los perfiles de ácidos grasos de clases de lípido aisladas para dos muestras de biomasa adicionales de la cepa de microorganismos ATCC PTA-10212 (PTA-10212 Muestra N° 3 y PTA-10212 Muestra N° 4). Se obtuvo aceite en bruto de cada muestra por extracción con hexano, y se aislaron clases de lípido individuales usando cromatografía ultrarrápida de baja presión. Se determinaron los perfiles de ácidos grasos de la biomasa, aceite en bruto y fracciones aisladas usando GC-FID como FAME. Los resultados se muestran en las Tablas 36-39, a continuación. Se observa que los perfiles de ácidos grasos de las Tablas 36-39 se obtuvieron de muestras extraídas usando una extracción típica con hexano. Se espera que los perfiles de ácidos grasos de las Tablas 36-39 sean sustancialmente los mismos si las muestras se extrajeran usando los procesos de la presente invención.

Se aislaron clases de lípidos individuales de una muestra de aceite en bruto de la cepa de microorganismos ATCC PTA-10212 (Muestra N° 5 de PTA-10212) previamente extraída usando el proceso FRIOLEX®, y se determinaron los perfiles de ácidos grasos de cada clase usando GC-FID como FAME. Los resultados se muestran en las Tablas 40 y 41, a continuación. Se observa que los perfiles de grasas y ácidos de las Tablas 40 y 41 se obtuvieron de muestras extraídas usando un proceso FRIOLEX®. Se espera que los perfiles de ácidos grasos de las Tablas 40 y 41 sean sustancialmente los mismos si las muestras se extrajeran usando los procesos de la presente invención.

Se aislaron clases de lípidos individuales de una muestra de aceite en bruto de la cepa de microorganismos ATCC PTA-10208 (Muestra N° 3 de PTA-10208) usando HPLC normal con identificación por ELSD y APCI-MS.

Procedimientos experimentales

Extracción de aceite en bruto - Se extrajo aceite en bruto de muestras de biomasa liofilizada usando trituración con disolvente. Por ejemplo, se pesaron aproximadamente 3 gramos de biomasa en un tubo Swedish. Se añadieron tres rodamientos de bolas y 30 mL de hexano al tubo de Swedish, que se cerró con un tapón de neopreno y se dispuso en un agitador durante 2 horas. Se filtró la suspensión resultante usando un embudo Buchner y papel de filtro Whatman. Se recogió el líquido filtrado, se retiró el disolvente a vacío, y se determinó gravimétricamente la cantidad de lípido en bruto restante.

ES 2 758 782 T3

5 *Análisis de ácidos grasos* - Se analizaron las muestras de biomasa, lípido en bruto extraído y clases de lípido aisladas para la composición de ácidos grasos como FAME. Brevemente, se pesaron directamente en tubos de ensayo de tapa roscada biomasa liofilizada y clases de lípido aisladas, mientras que muestras del aceite en bruto se disolvieron en hexano dando una concentración de aproximadamente 2 mg/mL. Se añadió a cada tubo tolueno, que contenía patrón interno, y HCl 1,5 N en metanol. Los tubos se agitaron con vórtex, luego se taparon y se calentaron hasta 100 °C durante 2 horas. Se dejó que los tubos se enfriaran, y se añadió saturado NaCl en agua. Los tubos se agitaron nuevamente con vórtex y se centrifugaron para permitir que se separaran las capas. Entonces se dispuso una porción de la fase orgánica en un vial de CG y se analizó por GC-FID. Se cuantificó FAME usando una curva de calibración de 3 puntos generada usando el patrón de referencia GLC de Nu-Chek-Prep (Nu-Chek, Elysian, MN). Se expresaron los ácidos grasos presentes en el extracto como mg/g y como un porcentaje en peso. Se estimó el contenido de grasas en las muestras suponiendo respuesta igual al patrón interno cuando se analiza por GC-FID.

Método de HPLC/ELSD/MS

Instrumento Agilent 1100 HPLC, Alltech 3300 ELSD, Agilent 1100 MSD

Columna Phenomenex Luna Silica, 250 x 4,6 mm

15 tamaño de partícula de 5 µm con precolumna

Fase móvil A – 99,5 % de hexanos (Omnisolv)

0,4 % de alcohol isopropílico (Omnisolv)

0,1 % de ácido acético

B – 99,9 % de etanol (Omnisolv, 95:5 de etanol:IPA)

20 0,1 % de ácido acético

Gradiente

Tiempo, min	% de A	% de B
0	100	0
5	100	0
15	85	10
20	0	100
25	0	100
26	100	0
35	100	0

Temp. de columna 30 °C

Caudal 1,5 mL/min

25 Volumen de inyección 5 µL

Detección de ELSD Temperatura 35 °C, flujo de gas 1,2 L/min

MSD Intervalo de masa 200 – 1200, fragmentador 225 V

Temperatura del gas de secado 350 °C

Temperatura del vaporizador 325 °C

30 Voltaje capilar 3500 V

Corriente de corona 10 µA

Extracción en fase sólida - Se separaron fracciones de PL del lípido en bruto por extracción en fase sólida (SPE) usando cartuchos de aminopropilo de 2 g (Biotage, Uppsala, Suecia) dispuestos en un aparato Vac Elut (Varian Inc, Palo Alto, EE. UU.). El cartucho se acondicionó con 15 mL de hexano, y se disolvieron ~60 mg de cada muestra en

1 mL de CHCl_3 y se aplicaron al cartucho. La columna se lavó con 15 mL de 2:1 de CHCl_3 :alcohol isopropílico para eluir todos los lípidos neutros, que se desecharon. Entonces se eluyeron los ácidos grasos con 15 mL de 2 % de ácido acético (HOAc) en éter, que se desecharon. Se eluyó la porción de PL con 15 mL de 6:1 de metanol:cloroformo, que se recogieron, se secaron bajo nitrógeno y se pesaron.

5 *Cromatografía ultrarrápida* - Se usó cromatografía ultrarrápida para separar las clases de lípidos presentes en el aceite en bruto. Se inyectaron aproximadamente 200 mg de aceite en bruto disueltos en hexano sobre la cabeza de la columna. El sistema de cromatografía utilizó el gel de sílice 60 (EMD Chemical, Gibbstown, NJ) con fase móvil compuesta de éter de petróleo y acetato de etilo a 5 mL/min (Tablas 6-7) o 3 mL/min (Tablas 8-13). Se usó un gradiente de etapa para eluir selectivamente cada clase de lípido de la columna. El gradiente de fase móvil empezó desde 100 % de éter de petróleo y terminó con 50 % de acetato de etilo. Se recogieron fracciones en tubos de ensayo de 10 mL usando un colector de fracciones de lecho grande Gilson FC 204 (Gilson, Inc., Middleton, WI).
10 Cada tubo se analizó por cromatografía en capa fina (CCF) y se reunieron los tubos que contenían clases de lípidos individuales (como se determina por manchas individuales sobre la placa de CCF con factor de retención esperado (Rf)), se concentraron a sequedad y se pesaron. Entonces se determinó gravimétricamente el contenido de fracción total.
15

Análisis de CCF - Se realizó cromatografía en capa fina sobre placas de gel de sílice. Se eluyeron las placas usando un sistema de disolventes que consistía en éter de petróleo : etil éter : ácido acético (80:20:1) y se visualizaron usando vapor de yodo. Entonces se compararon los valores de Rf de cada mancha con los valores bibliográficos informados para cada clase de lípido.

20 *Análisis de fracciones de TAG y PL* - Se analizaron las fracciones aisladas de TAG y PL para composición de ácidos grasos como ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME). Se disolvieron en hexano las fracciones de TAG dando una concentración de aproximadamente 1-2 mg/mL. Se concentraron alícuotas de 1 mL de las disoluciones a sequedad bajo nitrógeno. Se añadió tolueno, que contiene patrón interno, y HCl 1,5 N en metanol a cada tubo. Los tubos se agitaron con vórtex, luego se taparon y se calentaron hasta 100 °C durante 2 horas. Se añadieron patrón interno y HCl metanol directamente a los tubos que contenían la fracción de PL y se calentaron. Se dejó que se enfriaran los tubos, y se añadió NaCl saturado en agua. Nuevamente se agitaron con vórtex los tubos y se centrifugaron para permitir que se separaran las capas. Entonces se dispuso una porción de la fase orgánica en un vial de GC y se analizó por GC-FID. Se cuantificaron FAMEs usando una curva de calibración de 3 puntos generada usando el patrón de referencia GLC 502B de Nu-Chek-Prep (Nu-Chek, Elysian, MN). Los ácidos grasos presentes en el extracto se expresaron como mg/g y como un % de FAME.
25
30

Resultados

Muestra Nº 1 de PTA-10208

Se determinó el perfil de ácidos grasos de la biomasa y el lípido en bruto extraído para la Muestra Nº 1 de PTA-10208 usando GC/FID. Se transesterificaron *in situ* ácidos grasos en la biomasa pesando 28,6 mg de biomasa directamente en un tubo de FAME, mientras que se preparó una muestra del lípido en bruto extraído pesando 55,0 mg de lípido en bruto en un matraz volumétrico de 50 mL y transfiriendo 1 mL a un tubo de FAMEs separado. Se determinó que el contenido de lípido en bruto estimado de la biomasa era 53,2 % (como SUMA de FAME) usando GC con detección de FID, mientras que se extrajo 52,0 % (p/p) de lípido de la biomasa seca, dando un 97,8 % de recuperación de lípido total. Se determinó que el lípido en bruto era 91,9 % de ácidos grasos (como SUMA de FAME) usando GC/FID. Los principales ácidos grasos contenidos en el lípido en bruto fueron C16:0 (182,5 mg/g), C20:5 n-3 (186,8 mg/g) y C22:6 n-3 (423,1 mg/g).
35
40

Se determinó el perfil de la clase de lípidos del lípido en bruto extraído pesando 55,0 mg de lípido en bruto en un matraz volumétrico de 50 mL y transfiriendo una alícuota en un vial de HPLC para análisis de HPLC/ELSD/MS. Según el análisis de HPLC/ELSD/MS, el lípido en bruto contuvo 0,2 % de ésteres de esteroles (SE), 95,1 % de TAG, 0,4 % de esteroides y 0,5 % de 1,2-diacilglicerol (DAG). 5 % de la fracción de TAG incluyó un pico que eluyó directamente después del pico de TAG, pero no dio un espectro de masas reconocible.
45

El TAG aislado de esta muestra como se ha determinado por cromatografía ultrarrápida constituyó aproximadamente 92,4 % del aceite en bruto. No se detectó PL en peso o CCF después del aislamiento de SPE. Los principales ácidos grasos (>50 mg/g) contenidos en el TAG fueron C16:0 (189 mg/g), C20:5 n-3 (197 mg/g) y C22:6 n-3 (441 mg/g).

Muestra Nº 2 de PTA-10208

Se determinó el perfil de ácidos grasos de la biomasa y lípido en bruto extraído para la Muestra Nº 2 de PTA-10208 usando GC/FID. Se transesterificaron *in situ* ácidos grasos en la biomasa pesando 32,0 mg de biomasa directamente en un tubo de FAME, mientras que se preparó una muestra del lípido en bruto extraído pesando 60,1 mg de lípido en bruto en un matraz volumétrico de 50 mL y transfiriendo 1 mL a un tubo de FAMEs separado. Se determinó que el contenido de lípido en bruto estimado de la biomasa era 52,4 % (como SUMA de FAME) usando GC con detección de FID, mientras que se extrajo 48,0 % (p/p) de lípido de la biomasa seca, dando un 91,7 % de recuperación de lípido total. Se determinó que el lípido en bruto era 95,3 % de ácidos grasos (como SUMA de
50
55

FAME) usando GC/FID. Los principales ácidos grasos contenidos en el lípido en bruto fueron C16:0 (217,5 mg/g), C20:5 n-3 (169,3 mg/g) y C22:6 n-3 (444,1 mg/g).

5 Se determinó el perfil de la clase de lípidos del lípido en bruto extraído pesando 60,1 mg de lípido en bruto en un matraz volumétrico de 50 mL y transfiriendo una alícuota en un vial de HPLC para análisis de HPLC/ELSD/MS. Según el análisis de HPLC/ELSD/MS, el lípido en bruto contuvo 0,2 % de SE, 95,7 % de TAG, 0,3 % de esteroides y 0,7 % de 1,2-DAG. 5,1 % de la fracción de TAG incluyó un pico que eluyó directamente después del pico de TAG, pero no dio un espectro de masas reconocible.

10 El TAG aislado de esta muestra constituyó aproximadamente 93,9 % del aceite en bruto. No se detectó PL en peso o TLC después del aislamiento de SPE. Los principales ácidos grasos (>50 mg/g) contenidos en el TAG fueron C16:0 (218 mg/g), C20:5 n-3 (167 mg/g) y C22:6 n-3 (430 mg/g).

Muestra Nº 3 de PTA-10208

15 Se analizó una muestra de aceite en bruto del microorganismo depositado con Nº de acceso ATCC PTA-10208 (Muestra PTA-10208 Nº 3) usando HPLC/ELSD/MS. Se recuperaron un total de 98,38 % de lípidos, representando la fracción de éster de esteroles (SE) 0,32 %, representando la fracción de TAG 96,13 %, representando la fracción de 1,3-diacilglicerol (DAG) 0,22 %, representando la fracción de 1,2-DAG 0,78 %, y representando la fracción de esteroides 0,93 %.

Muestra Nº 1 de PTA-10212

20 Se determinó el perfil de ácidos grasos de la biomasa y lípido en bruto extraído para la Muestra Nº 1 de PTA-10212 usando GC/FID. Se transesterificaron *in situ* ácidos grasos en la biomasa pesando 27,0 mg de biomasa directamente en un tubo de FAME, mientras que se preparó una muestra del lípido en bruto extraído pesando 52,5 mg de lípido en bruto en un matraz volumétrico de 50 mL y transfiriendo 1 mL a un tubo de FAME separado. Se determinó que el contenido de lípido en bruto estimado de la biomasa era 38,3 % (como SUMA de FAME) usando GC con detección de FID, mientras que se extrajo 36,3 % (p/p) de lípido de la biomasa seca, dando un 94,6 % de recuperación de lípido total. Se determinó que el lípido en bruto era 83,2 % de ácidos grasos (como SUMA de FAME) usando GC/FID. Los principales ácidos grasos contenidos en el lípido en bruto fueron C16:0 (328,5 mg/g), C20:5 n-3 (90,08 mg/g) y C22:6 n-3 (289,3 mg/g).

30 Se determinó el perfil de la clase de lípidos del lípido en bruto extraído pesando 52,5 mg de lípido en bruto en un matraz volumétrico de 50 mL y transfiriendo una alícuota en un vial de HPLC para análisis de HPLC/ELSD/MS. Según el análisis de HPLC/ELSD/MS, el lípido en bruto contuvo 0,2 % de SE, 64,2 % de TAG, 1,9 % de FFA, 2,8 % de 1,3-DAG, 1,4 % de esteroides, 18,8 % de 1,2-DAG, y 0,5 % de MAG. 3,4 % de la fracción de TAG incluyó un pico que eluyó directamente después del pico de TAG, pero no dio un espectro de masas reconocible.

35 El TAG aislado de esta muestra constituyó aproximadamente 49,8 % del aceite en bruto. El PL aislado constituyó aproximadamente 8,1 % del aceite en bruto. Los principales ácidos grasos (>50 mg/g) contenidos en la fracción de TAG son C16:0 (400 mg/g), C20:5 n-3 (91 mg/g) y C22:6 n-3 (273 mg/g). Los principales ácidos grasos (>50 mg/g) contenidos en la fracción de PL son C16:0 (98 mg/g), C20:5 n-3 (33 mg/g) y C22:6 n-3 (227 mg/g).

Muestra Nº 2 de PTA-10212

40 Se determinó el perfil de ácidos grasos de la biomasa y lípido en bruto extraído para la Muestra Nº 2 de PTA-10212 usando GC/FID. Se transesterificaron *in situ* ácidos grasos en la biomasa pesando 29,5 mg de biomasa directamente en un tubo de FAME, mientras que se preparó una muestra del lípido en bruto extraído pesando 56,5 mg de lípido en bruto en un matraz volumétrico de 50 mL y transfiriendo 1 mL a un tubo de FAME separado. Se determinó que el contenido de lípido en bruto estimado de la biomasa era 40,0 % (como SUMA de FAME) usando GC con detección de FID, mientras que 41,3 % (p/p) de lípido se extrajo de la biomasa seca, dando un 106,1 % de recuperación de lípido total. Se determinó que el lípido en bruto era 82,8 % de ácidos grasos (como SUMA de FAME) usando GC/FID. Los principales ácidos grasos contenidos en el lípido en bruto fueron C16:0 (327,3 mg/g), C20:5 n-3 (92,5 mg/g) y C22:6 n-3 (277,6 mg/g).

50 Se determinó el perfil de la clase de lípidos del lípido en bruto extraído pesando 56,5 mg de lípido en bruto en un matraz volumétrico de 50 mL y transfiriendo una alícuota en un vial de HPLC para análisis de HPLC/ELSD/MS. Según el análisis de HPLC/ELSD/MS, el lípido en bruto contuvo 0,2 % de SE, 58,2 % de TAG, 2,3 % de FFA, 3,4 % de 1,3-DAG, 1,7 % de esteroides, 23,4 % de 1,2-DAG y 0,6 % de MAG. 3,3 % de la fracción de TAG incluyó un pico que eluyó directamente después del pico de TAG, pero no dio un espectro de masas reconocible.

55 El TAG aislado de esta muestra constituyó aproximadamente 51,9 % del aceite en bruto. El PL aislado constituyó aproximadamente 8,8 % del aceite en bruto. Los principales ácidos grasos (>50 mg/g) contenidos en la fracción de TAG son C16:0 (402 mg/g), C20:5 n-3 (92 mg/g) y C22:6 n-3 (245 mg/g). Los principales ácidos grasos (>50 mg/g) contenidos en la fracción de PL son C16:0 (121 mg/g), C20:5 n-3 (48 mg/g) y C22:6 n-3 (246 mg/g).

ES 2 758 782 T3

Tabla 32: Perfiles de ácidos grasos de las biomásas y lípidos en bruto extraídos (mg/g) de PTA-10208 y PTA-10212

	Muestra Nº 1 de PTA- 10208 Biomasa	Muestra Nº 1 de PTA- 10208 Lípido en bruto	Muestra Nº 2 de PTA- 10208 Biomasa	Muestra Nº 2 de PTA- 10208 Lípido en bruto	Muestra Nº 1 de PTA- 10212 Biomasa	Muestra Nº 1 de PTA- 10212 Lípido en bruto	Muestra Nº 2 de PTA- 10212 Biomasa	Muestra Nº 2 de PTA- 10212 Lípido en bruto
Ácido graso	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME
C12:0	1,47	2,43	1,80	3,14	0,99	1,90	0,87	1,91
C14:0	11,62	20,12	16,72	31,03	5,51	12,91	5,97	13,69
C14:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C15:0	2,43	3,75	3,60	6,22	9,13	20,42	9,39	20,81
C16:0	105,04	182,47	117,72	217,49	145,87	328,45	147,87	327,27
C16:1	0,00	0,00	0,06	0,01	6,26	14,53	7,46	16,89
C18:0	5,37	8,96	4,77	8,37	6,77	15,39	6,77	15,15
C18:1 n-9	0,00	3,26	0,00	3,09	0,03	4,04	0,08	5,87
C18:1 n-7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C18:2 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:0	1,48	1,79	1,40	1,15	1,60	3,09	1,67	3,20
C18:3 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C18:4 n-3	0,91	1,61	1,10	2,00	2,28	2,56	2,21	2,64
C20:2 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:3 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:0	0,10	0,00	0,08	0,00	0,30	0,12	0,35	0,24
C20:4 n-7	0,81	0,45	0,67	0,41	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:4 n-6	7,22	12,23	6,84	12,18	1,19	2,26	1,31	2,32
C22:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:4 n-5	0,63	0,52	0,00	0,46	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:4	3,45	5,45	3,33	5,58	0,00	2,40	0,00	2,34
C20:3	0,09	0,00	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:5 n-3	10731	186,83	92,99	169,32	40,32	90,08	43,15	92,54
C22:4 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C24:0	0,60	0,00	0,52	0,00	2,81	6,83	2,74	6,53
C24:1 n-9	1,55	3,26	0,85	2,04	0,43	1,34	0,42	1,24
C22:5 n-6	9,66	15,84	10,27	17,98	2,42	4,68	2,32	4,21

ES 2 758 782 T3

	Muestra Nº 1 de PTA- 10208 Biomasa	Muestra Nº 1 de PTA- 10208 Lípido en bruto	Muestra Nº 2 de PTA- 10208 Biomasa	Muestra Nº 2 de PTA- 10208 Lípido en bruto	Muestra Nº 1 de PTA- 10212 Biomasa	Muestra Nº 1 de PTA- 10212 Lípido en bruto	Muestra Nº 2 de PTA- 10212 Biomasa	Muestra Nº 2 de PTA- 10212 Lípido en bruto
Ácido graso	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME
C22:5 n-3	20,44	35,13	9,92	17,50	2,41	4,94	2,69	5,23
C22:6 n-3	246,98	423,10	245,96	444,08	139,58	289,34	137,35	277,57
Suma de FAME	527,15	907,18	518,71	942,75	367,89	805,29	372,63	799,68

Tabla 33: Perfiles de ácidos grasos de las biomazas y lípidos en bruto extraídos (%) de PTA-10208 y PTA-10212

	Muestra Nº 1 de PTA- 10208 Biomasa	Muestra Nº 1 de PTA- 10208 Lípido en bruto	Muestra Nº 2 de PTA- 10208 Biomasa	Muestra Nº 2 de PTA- 10208 Lípido en bruto	Muestra Nº 1 de PTA- 10212 Biomasa	Muestra Nº 1 de PTA- 10212 Lípido en bruto	Muestra Nº 2 de PTA- 10212 Biomasa	Muestra Nº 2 de PTA- 10212 Lípido en bruto
Ácido graso	% de FAME	% de FAME						
C12:0	0,28	0,27	0,35	0,33	0,27	0,24	0,23	0,24
C14:0	2,20	2,22	3,22	3,29	1,50	1,60	1,60	1,71
C14:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C15:0	0,46	0,41	0,69	0,66	2,48	2,54	2,52	2,60
C16:0	19,93	20,11	22,70	23,07	39,65	40,19	39,68	40,93
C16:1	0,00	0,00	0,01	0,00	1,70	1,80	2,00	2,11
C18:0	1,02	0,99	0,92	0,89	1,84	1,91	1,12	1,89
C18:1	0,00	0,36	0,00	0,33	0,01	0,50	0,02	0,73
C18:1 n-7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C18:2 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:0	0,28	0,20	0,27	0,20	0,43	0,38	0,45	0,40
C18:3 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C18:4 n-3	0,17	0,18	0,21	0,21	0,62	0,32	0,59	0,33
C20:2 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:3 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:0	0,02	0,00	0,01	0,00	0,08	0,02	0,09	0,03
C20:4 n-7	0,15	0,05	0,13	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:4 n-6	137	1,35	1,32	1,29	0,32	0,28	035	0,29

ES 2 758 782 T3

	Muestra Nº 1 de PTA- 10208 Biomasa	Muestra Nº 1 de PTA- 10208 Lípido en bruto	Muestra Nº 2 de PTA- 10208 Biomasa	Muestra Nº 2 de PTA- 10208 Lípido en bruto	Muestra Nº 1 de PTA- 10212 Biomasa	Muestra Nº 1 de PTA- 10212 Lípido en bruto	Muestra Nº 2 de PTA- 10212 Biomasa	Muestra Nº 2 de PTA- 10212 Lípido en bruto
Ácido graso	% de FAME	% de FAME						
C22:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:4 n-5	0,12	0,06	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:4 n-3	0,65	0,60	0,64	0,59	0,00	0,30	0,00	0,29
C20:3 n-3	0,02	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:5 n-3	20,36	20,59	17,93	17,96	10,96	11,19	11,58	11,57
C22:4 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C24:0	0,11	0,00	0,10	0,00	0,76	0,85	0,74	0,82
C24:1 n-9	0,29	0,36	0,16	0,22	0,12	0,17	0,11	0,16
C22:5 n-6	1,83	1,75	1,98	1,91	0,66	0,58	0,62	0,53
C22:5 n-3	3,88	3,87	1,91	1,86	0,65	0,61	0,72	0,65
C22:6 n-3	46,85	46,64	47,42	47,10	37,94	35,93	36,86	34,71
Suma de % de FAME	100	100	100	100	100	100	100	100

Tabla 34: Perfiles de ácidos grasos de TAG aislados de PTA-10208 y PTA-10212

	Muestra Nº 1 de PTA- 10208	Muestra Nº 1 de PTA- 10208	Muestra Nº 2 de PTA- 10208	Muestra Nº 2 de PTA- 10208	Muestra Nº 1 de PTA- 10212	Muestra Nº 1 de PTA- 10212	Muestra Nº 2 de PTA- 10212	Muestra Nº 2 de PTA- 10212
Ácido graso	FAME (mg/g)	% de FAME						
C12:0	2,57	0,27	3,35	0,36	0,00	0,00	0,00	0,00
C14:0	21,07	2,23	31,37	3,41	14,05	1,61	14,45	1,69
C14:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C15:0	3,89	0,41	6,17	0,67	23,27	2,66	23,14	2,71
C16:0	189,28	20,07	218,78	23,75	399,51	45,75	402,43	47,07
C16:1	0,00	0,00	0,00	0,00	15,23	1,74	17,62	2,06
C18:0	9,21	0,98	8,07	0,88	22,70	2,60	23,10	2,70
C18:1 n-9	3,35	0,36	3,64	0,40	6,12	0,70	7,48	0,87
C18:1 n-7	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
C18:2 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:0	1,86	0,20	1,55	0,17	4,76	0,55	5,32	0,62

ES 2 758 782 T3

	Muestra Nº 1 de PTA- 10208	Muestra Nº 1 de PTA- 10208	Muestra Nº 2 de PTA- 10208	Muestra Nº 2 de PTA- 10208	Muestra Nº 1 de PTA- 10212	Muestra Nº 1 de PTA- 10212	Muestra Nº 2 de PTA- 10212	Muestra Nº 2 de PTA- 10212
C18:3 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C18:4 n-3	1,64	0,17	2,00	0,22	2,25	0,26	2,24	0,26
C20:2 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:3 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,55	0,06	0,89	0,10
Desconocido	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:4 n-7	0,39	0,04	0,05	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:3 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:4 n-6	12,79	1,36	11,82	1,28	2,33	0,27	2,25	0,26
C22:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:4 n-5	0,39	0,04	0,07	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:4 n-3	5,52	0,59	5,09	0,55	2,87	0,33	2,98	0,35
C20:5 n-3	197,14	20,90	166,68	18,10	91,17	10,44	91,78	10,74
C24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	6,93	0,79	7,36	0,86
C22:4 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C24:1 n-9	1,08	0,11	<0,1	<0,1	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:5	15,88	1,68	16,57	1,80	4,01	0,46	3,39	0,40
C22:5 n-3	36,05	3,82	16,00	1,74	4,53	0,52	5,07	0,59
C22:6 n-3	440,99	46,76	429,83	46,67	273,02	31,26	245,38	28,70
Suma de FAME	943,11		921,03	-	873,31		854,89	-
% total de FAME	-	100,00	-	100,00	-	100,00	-	100,00

Tabla 35: Perfiles de ácidos grasos de PL aislados de PTA-10212

	Muestra Nº 1 de PTA-10212	Muestra Nº 1 de PTA-10212	Muestra Nº 2 de PTA-10212	Muestra Nº 2 de PTA-10212
Ácido graso	FAME (mg/g)	% de FAME	FAME (mg/g)	% de FAME
C12:0	0,00	0,00	0,00	0,00
C14:0	0,93	0,22	1,89	0,39
C14:1	0,00	0,00	0,00	0,00
C15:0	3,44	0,82	5,07	1,05
C16:0	98,29	23,50	120,98	25,00

ES 2 758 782 T3

	Muestra N° 1 de PTA-10212	Muestra N° 1 de PTA-10212	Muestra N° 2 de PTA-10212	Muestra N° 2 de PTA-10212
Ácido graso	FAME (mg/g)	% de FAME	FAME (mg/g)	% de FAME
C16:1	1,15	0,27	3,07	0,63
C18:0	3,25	0,78	3,72	0,77
C18:1 n-9	1,12	0,27	0,95	0,20
C18:1 n-7	<0,1	<0,1	0,02	0,003
C18:2 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:0	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
C18:3 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00
C18:4 n-3	3,71	0,89	3,24	0,67
C20:2 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:3 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:0	0,00	0,00	0,00	0,00
Desconocido	42,33	10,12	44,71	9,24
C20:4 n-7	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:3 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:4 n-6	0,84	0,20	1,54	0,32
C22:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:4 n-5	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:4 n-3	<0,1	<0,1	0,27	0,06
C20:5 n-3	33,39	7,98	47,91	9,90
C24:0	<0,1	<0,1	0,01	0,001
C22:4 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00
C24:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:5 n-6	3,08	0,74	3,82	0,79
C22:5 n-3	<0,1	<0,1	0,66	0,14
C22:6 n-3	226,68	54,20	246,09	50,85
Suma de FAME	418,21	-	483,94	-
% total de FAME	-	100	-	100

Muestra N° 3 de PTA-10212

Se estimó que el contenido de lípido de la biomasa para la Muestra N° 3 de PTA-10212 era 34 % como la suma de FAME, y la cantidad de aceite en bruto obtenido después de extracción con disolvente era 37 % en peso, dando un 109 % de recuperación de grasa presente en la biomasa. Después del fraccionamiento usando cromatografía

ES 2 758 782 T3

ultrarrápida, se aisló aproximadamente 46 % del aceite en bruto como TAG, se aisló 28 % como DAG. El aceite en bruto contuvo 309 mg/g de DHA y 264 mg/g de EPA. El TAG aislado contuvo 341 mg/g de DHA y 274 mg/g de EPA. La fracción de DAG aislada contuvo 262 mg/g de DHA y 237 mg/g de EPA. Los perfiles de ácidos grasos totales de la biomasa, aceite en bruto extraído y fracciones aisladas se muestran a continuación en la Tabla 36 y Tabla 37 calculados como mg/g y % de FAME, respectivamente.

5

Tabla 36: Perfiles de ácidos grasos de biomasa y lípido en bruto extraído (mg/g) de la Muestra N° 3 de PTA-10212

	Biomasa	Aceite en bruto	TAG	DAG
% en peso	NA	37,2 %	46,0 %	27,9 %
Ácido graso	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)
C12:0	0,0	0,0	0,0	0,0
C14:0	3,6	10,3	11,5	9,4
C14:1	0,0	0,0	0,0	0,0
C15:0	4,1	10,6	9,8	6,6
C16:0	70,5	181,8	231,7	111,3
C16:1	6,7	19,1	18,7	17,1
C18:0	2,4	10,2	14,2	0,0
C18:1 n-9	0,0	6,7	0,0	0,0
C18:1 n-7	0,0	1,2	0,0	0,0
C18:2 n-6	0,0	1,8	0,0	0,0
C20:0	0,0	2,4	0,0	0,0
C18:3 n-3	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:1 n-9	0,0	0,3	0,0	1,7
C18:4 n-3	1,9	3,4	3,2	4,4
C20:2 n-6	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 n-6	0,0	0,0	0,0	0,0
C22:0	3,3	0,0	0,0	0,0
C20:4 n-7	0,0	2,1	1,5	0,0
C20:3 n-3	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 n-6	6,8	17,9	21,4	13,8
C22:1 n-9	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 n-5	0,0	1,3	1,3	0,0
C20:4 n-3	3,0	8,5	10,9	6,4
C20:5 n-3	102,0	263,6	274,2	237,4
C24:0	0,0	1,7	3,9	0,0
C22:4 n-9	0,0	0,0	0,0	0,0
C24:1 n-9	0,0	0,0	4,2	0,0
C22:5 n-6	3,2	8,3	10,7	6,1

ES 2 758 782 T3

	Biomasa	Aceite en bruto	TAG	DAG
C22:5 n-3	3,8	10,4	15,1	6,6
C22:6 n-3	131,2	309,4	341,1	261,9
Suma de FAME	342,4	871,1	973,2	682,6

Tabla 37: Perfiles de ácidos grasos de biomasa y lípido en bruto extraído (%) de la Muestra N° 3 de PTA-10212

	Biomasa	Aceite en bruto	TAG	DAG
% en peso	NA	37,2 %	46,0 %	27,9 %
Ácido graso	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)
C12:0	0,0	0,0	0,0	0,0
C14:0	1,1	1,2	1,2	1,4
C14:1	0,0	0,0	0,0	0,0
C15:0	1,2	1,2	1,0	1,0
C16:0	20,6	20,9	23,8	16,3
C16:1	2,0	2,2	1,9	2,5
C18:0	0,7	1,2	1,5	0,0
C18:1 n-9	0,0	0,8	0,0	0,0
C18:1 n-7	0,0	0,1	0,0	0,0
C18:2 n-6	0,0	0,2	0,0	0,0
C20:0	0,0	0,3	0,0	0,0
C18:3 n-3	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:1 n-9	0,0	0,0	0,0	0,2
C18:4 n-3	0,6	0,4	0,3	0,6
C20:2 n-6	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 n-6	0,0	0,0	0,0	0,0
C22:0	1,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 n-7	0,0	0,2	0,2	0,0
C20:3 n-3	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 n-6	2,0	2,1	2,2	2,0
C22:1 n-9	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 n-5	0,0	0,1	0,1	0,0
C20:4 n-3	0,9	1,0	1,1	0,9
C20:5 n-3	29,8	30,3	28,2	34,8
C24:0	0,0	0,2	0,4	0,0
C22:4 n-9	0,0	0,0	0,0	0,0

ES 2 758 782 T3

	Biomasa	Aceite en bruto	TAG	DAG
C24:1 n-9	0,0	0,0	0,4	0,0
C22:5 n-6	0,9	1,0	1,1	0,9
C22:5 n-3	1,1	1,2	1,6	1,0
C22:6 n-3	38,3	35,5	35,1	38,4
% total de FAME	100,0	100,0	100,0	100,0

Muestra Nº 4 de PTA-10212

La Muestra Nº 4 de PTA-10212 contuvo aproximadamente 23 % de lípido determinado como la suma de FAME, de la que 107 % se recuperó usando extracción con hexano. Después del fraccionamiento usando cromatografía ultrarrápida, se aisló aproximadamente 42 % del aceite en bruto como TAG, se aisló 18 % como DAG. El aceite en bruto contuvo 275 mg/g de DHA y 209 mg/g de EPA. El TAG aislado contuvo 296 mg/g de DHA y 205 mg/g de EPA. La fracción de DAG aislada contuvo 245 mg/g de DHA y 219 mg/g de EPA. Los perfiles de ácidos grasos totales de la biomasa, aceite en bruto extraído y fracciones aisladas se muestran a continuación en la Tabla 38 (mg/g) y la Tabla 39 (% de FAME).

10 Tabla 38: Perfiles de ácidos grasos de biomasa y lípido en bruto extraído (mg/g) de la Muestra Nº 4 de PTA-10212

	Biomasa	Aceite en bruto	TAG	DAG
% en peso	NA	24,7 %	42,2 %	18,4 %
Ácido graso	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)
C12:0	0,0	0,0	2,1	2,4
C14:0	2,0	8,3	9,8	9,6
C14:1	0,0	0,0	0,0	0,0
C15:0	4,8	16,8	0,4	0,9
C16:0	63,3	210,6	285,7	138,0
C16:1	1,6	6,7	7,4	7,5
C18:0	2,8	12,2	19,9	4,6
C18:1 n-9	0,0	3,7	0,7	1,1
C18:1 n-7	0,0	0,0	0,3	1,2
C18:2 n-6	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:0	0,0	3,3	6,0	1,5
C18:3 n-3	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:1 n-9	0,0	0,0	0,7	1,2
C18:4 n-3	1,4	3,8	3,6	5,0
C20:2 n-6	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 n-6	0,0	0,0	0,4	0,0
C22:0	1,5	0,0	1,9	0,0
C20:4 n-7	0,0	0,0	0,9	0,6
C20:3 n-3	0,0	0,0	0,0	0,0

ES 2 758 782 T3

	Biomasa	Aceite en bruto	TAG	DAG
C20:4 n-6	2,5	10,1	13,0	10,3
C22:1 n-9	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 n-5	0,0	0,0	0,8	0,7
C20:4 n-3	1,4	6,3	8,6	6,0
C20:5 n-3	57,6	209,1	205,4	219,0
C24:0	0,0	2,6	0,8	0,0
C22:4 n-9	0,1	0,0	0,0	0,0
C24:1 n-9	0,0	0,0	1,1	0,5
C22:5 n-6	1,4	6,1	7,9	4,5
C22:5 n-3	4,0	15,8	20,8	12,9
C22:6 n-3	87,7	275,0	296,4	244,8
Suma de FAME	232,2	790,1	894,8	672,4

Tabla 39: Perfiles de ácidos grasos de biomasa y lípido en bruto extraído (%) de la Muestra N° 4 de PTA-10212

	Biomasa	Aceite en bruto	TAG	DAG
% en peso	NA	24,7 %	42,2 %	18,4 %
Ácido graso	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)
C12:0	0,0	0,0	0,2	0,4
C14:0	0,9	1,0	1,1	1,4
C14:1	0,0	0,0	0,0	0,0
C15:0	2,1	2,1	0,0	0,1
C16:0	27,3	26,7	31,9	20,5
C16:1	0,7	0,8	0,8	1,1
C18:0	1,2	1,5	2,2	0,7
C18:1 n-9	0,0	0,5	0,1	0,2
C18:1 n-7	0,0	0,0	0,0	0,2
C18:2 n-6	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:0	0,0	0,4	0,7	0,2
C18:3 n-3	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:1 n-9	0,0	0,0	0,1	0,2
C18:4 n-3	0,6	0,5	0,4	0,7
C20:2 n-6	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 n-6	0,0	0,0	0,0	0,0
C22:0	0,6	0,0	0,2	0,0

	Biomasa	Aceite en bruto	TAG	DAG
C20:4 n-7	0,0	0,0	0,1	0,1
C20:3 n-3	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 n-6	1,1	1,3	1,5	1,5
C22:1 n-9	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 n-5	0,0	0,0	0,1	0,1
C20:4 n-3	0,6	0,8	1,0	0,9
C20:5 n-3	24,8	26,5	23,0	32,6
C24:0	0,0	0,3	0,1	0,0
C22:4 n-9	0,0	0,0	0,0	0,0
C24:1 n-9	0,0	0,0	0,1	0,1
C22:5 n-6	0,6	0,8	0,9	0,7
C22:5 n-3	1,7	2,0	2,3	1,9
C22:6 n-3	37,8	34,8	33,1	36,4
% total de FAME	100,0	100,0	100,0	100,0

Muestra Nº 5 de PTA-10212

Se extrajo una muestra de aceite en bruto de una biomasa de PTA-10212 usando el proceso FRIOLEX® (GEA Westfalia Separator UK Ltd., Milton Keynes, Inglaterra) dando la Muestra Nº 5 de PTA-10212 de aceite microbiano. Se aislaron clases de lípidos individuales de la Muestra Nº 5 de PTA-10212 usando cromatografía ultrarrápida de baja presión, y se determinó el porcentaje en peso de cada clase. Se determinó el perfil de ácidos grasos de cada clase usando GC-FID.

Brevemente, la muestra se preparó disolviendo 240 mg de aceite en bruto en 600 µL de hexano y aplicando a la cabeza de la columna. Después del fraccionamiento de la muestra usando cromatografía ultrarrápida, los pesos combinados de todas las fracciones eran 240 mg dando una recuperación de 100 %. La fracción de ésteres de esteroles representó 0,9 %, la fracción de TAG representó 42,6 %, la fracción de ácidos grasos libres (FFA) representó 1,3 %, la fracción de esteroides representó 2,2 %, y la fracción de DAG representó 41,6 %. Los perfiles de ácidos grasos totales del aceite en bruto de FRIOLEX® y las fracciones aisladas se muestran a continuación en la Tabla 40 y la Tabla 41 calculadas como mg/g y % de FAME, respectivamente.

Tabla 40: Perfiles de ácidos grasos del aceite en bruto (mg/g) de la Muestra Nº 5 de PTA-10212

	Aceite en bruto	TAG	DAG
% en peso	NA	42,6 %	41,6 %
Ácido graso	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)
C12:0	0	0,7	1,0
C14:0	7,7	7,7	8,5
C14:1	0	0,0	0,0
C15:0	10,3	11,7	9,3
C16:0	179,3	217,7	134,6
C16:1	18,1	16,3	25,9
C18:0	8,1	13,2	2,3

ES 2 758 782 T3

	Aceite en bruto	TAG	DAG
C18:1 n-9	4,7	8,4	0,7
C18:1 n-7	0	1,8	1,0
C18:2 n-6	1,8	3,3	0,7
C20:0	1,9	3,6	0,2
C18:3 n-3	0	0,0	0,0
C20:1 n-9	0	0,7	1,0
C18:4 n-3	3,1	2,8	3,8
C20:2 n-6	0	0,0	0,0
C20:3 n-6	0	0,6	0,4
C22:0	0	1,5	0,0
C20:4 n-7	0	1,0	0,7
C20:3 n-3	0	0,0	0,0
C20:4 n-6	12,7	16,1	13,6
C22:1 n-9	0	0,0	0,0
C20:4 n-5	0	1,5	0,8
C20:4 n-3	6,5	9,3	6,4
C20:5 n-3	213,3	223,7	252,8
C24:0	2,3	4,4	0,6
C22:4 n-9	0	1,9	0,9
C24:1 n-9	0	0,0	0,0
C22:5 n-6	7,9	9,5	8,3
C22:5 n-3	13	20,6	9,7
C22:6 n-3	305,6	327,4	353,8
Suma de FAME	796,6	905,3	837,4

Tabla 41: Perfiles de ácidos grasos del aceite en bruto (%) de la Muestra N° 5 de PTA-10212

	Aceite en bruto	TAG	DAG
Ácido graso	% de FAME	% de FAME	% de FAME
C12:0	0	0,1	0,1
C14:0	1	0,9	1,0
C14:1	0	0,0	0,0
C15:0	1,3	1,3	1,1
C16:0	22,5	24,0	16,1
C16:1	2,3	1,8	3,1

ES 2 758 782 T3

	Aceite en bruto	TAG	DAG
C18:0	1	1,5	0,3
C18:1 n-9	0,6	0,9	0,1
C18:1 n-7	0	0,2	0,1
C18:2 n-6	0,2	0,4	0,1
C20:0	0,2	0,4	0,0
C18:3 n-3	0	0,0	0,0
C20:1 n-9	0	0,1	0,1
C18:4 n-3	0,4	0,3	0,5
C20:2 n-6	0	0,0	0,0
C20:3 n-6	0	0,1	0,0
C22:0	0	0,2	0,0
C20:4 n-7	0	0,1	0,1
C20:3 n-3	0	0,0	0,0
C20:4 n-6	1,6	1,8	1,6
C22:1 n-9	0	0,0	0,0
C20:4 n-5	0	0,2	0,1
C20:4 n-3	0,8	1,0	0,8
C20:5 n-3	26,8	24,7	30,2
C24:0	0,3	0,5	0,1
C22:4 n-9	0	0,2	0,1
C24:1 n-9	0	0,0	0,0
C22:5 n-6	1	1,1	1,0
C22:5 n-3	1,6	2,3	1,2
C22:6 n-3	38,4	36,2	42,3
% total de FAME	100	100	100

Ejemplo 37

Se procesaron adicionalmente aceites en bruto mediante refinado, blanqueamiento y desodorización para obtener aceites refinados. Los aceites refinados se diluyeron con aceite de girasol alto oleico para obtener aceites finales con un contenido de DHA de aproximadamente 400 mg/g. Se aislaron clases de lípidos individuales y se determinaron los perfiles de ácidos grasos de cada clase usando GC-FID como FAME.

Aceites finales de PTA-10208

Los perfiles de ácidos grasos para los aceites finales N° 1-5 de PTA-10208 se resumen en las Tablas 42-43, que incluyen perfiles asociados dentro de la fracción de TAG aislados (Tablas 44-45) y la fracción de esteroides/DAG aislados (Tablas 46-47).

También se determinaron las clases de lípidos individuales en los aceites finales usando cromatografía ultrarrápida (Tabla 48) y HPLC normal con confirmación por ELSD y APCI-MS (Tabla 49).

ES 2 758 782 T3

Tabla 42: Perfiles de ácidos grasos de aceites finales de PTA-10208 (mg/g)

	Aceite final N° 1 de PTA-10208	Aceite final N° 2 de PTA-10208	Aceite final N° 3 de PTA-10208	Aceite final N° 4 de PTA-10208	Aceite final N° 5 de PTA-10208
Ácido graso	FAME (mg/g)				
C12:0	2,5	2,4	2,8	2,7	2,7
C14:0	16,1	14,9	21,0	18,4	17,5
C14:1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C15:0	3,8	3,6	4,4	3,9	3,9
C16:0	192,1	179,1	193,1	184,3	194,6
C16:1	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5
C17:0	0,6	0,5	0,9	0,8	2,1
C18:0	12,8	13,9	11,5	12,3	12,9
C18:1 n-9	23,5	82,0	25,7	26,0	29,5
C18:1 n-7	0,2	0,7	0,1	0,1	0,1
C18:2 n-6	3,7	8,1	4,0	4,1	4,3
C20:0	4,3	4,1	3,7	4,0	4,0
C18:3 n-3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:1 n-9	<0,1	0,1	<0,1	<0,1	<0,1
C18:4 n-3	2,4	2,5	2,8	2,7	2,8
C20:2 n-6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 n-6	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1
C22:0	1,2	1,8	1,0	1,1	1,1
C20:4 n-7	1,7	1,6	1,7	1,8	1,6
C20:3 n-3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 n-6	12,9	12,1	13,5	13,5	13,3
C22:1 n-9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 n-5	1,6	1,4	1,5	1,7	1,5
C20:4 n-3	6,0	5,7	6,0	6,0	6,1
C20:5 n-3	173,8	163,3	196,4	209,6	197,9
C24:0	1,4	1,6	1,3	1,3	1,0
C22:4 n-9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C24:1 n-9	3,4	3,2	2,3	2,6	2,3
C22:5 n-6	14,9	14,0	14,4	13,0	12,9
C22:5 n-3	43,9	41,3	32,8	40,3	36,9
C22:6 n-3	394,8	373,7	373,2	374,3	364,2

ES 2 758 782 T3

	Aceite final N° 1 de PTA-10208	Aceite final N° 2 de PTA-10208	Aceite final N° 3 de PTA-10208	Aceite final N° 4 de PTA-10208	Aceite final N° 5 de PTA-10208
Ácido graso	FAME (mg/g)				
Suma de FAME	918,1	932,2	914,7	925,1	914,1

Tabla 43: Perfiles de ácidos grasos de aceites finales de PTA-10208 (%)

	Aceite final N° 1 de PTA-10208	Aceite final N° 2 de PTA-10208	Aceite final N° 3 de PTA-10208	Aceite final N° 4 de PTA-10208	Aceite final N° 5 de PTA-10208
Ácido graso	% de FAME				
C12:0	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
C14:0	1,8	1,6	2,3	2,0	1,9
C14:1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C15:0	0,4	0,4	0,5	0,4	0,4
C16:0	20,9	19,2	21,1	19,9	21,3
C16:1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0,1
C17:0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2
C18:0	1,4	1,5	1,3	1,3	1,4
C18:1 n-9	2,6	8,8	2,8	2,8	3,2
C18:1 n-7	<0,1	0,1	<0,1	<0,1	<0,1
C18:2 n-6	0,4	0,9	0,4	0,4	0,5
C20:0	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4
C18:3 n-3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:1 n-9	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
C18:4 n-3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
C20:2 n-6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 n-6	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
C22:0	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1
C20:4 n-7	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
C20:3 n-3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 n-6	1,4	1,3	1,5	1,5	1,5
C22:1 n-9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 n-5	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
C20:4 n-3	0,7	0,6	0,7	0,7	0,7
C20:5 n-3	18,9	17,5	21,5	22,7	21,6
C24:0	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1
C22:4 n-9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

ES 2 758 782 T3

	Aceite final Nº 1 de PTA-10208	Aceite final Nº 2 de PTA-10208	Aceite final Nº 3 de PTA-10208	Aceite final Nº 4 de PTA-10208	Aceite final Nº 5 de PTA-10208
Ácido graso	% de FAME				
C24:1 n-9	0,4	0,3	0,2	0,3	0,2
C22:5 n-6	1,6	1,5	1,6	1,4	1,4
C22:5 n-3	4,8	4,4	3,6	4,4	4,0
C22:6 n-3	43,0	40,1	40,8	40,5	39,9

Tabla 44: Perfiles de ácidos grasos de TAG aislados: Aceites finales de PTA-10208 (mg/g)

	Aceite final Nº 1 de PTA-10208	Aceite final Nº 2 de PTA-10208	Aceite final Nº 3 de PTA-10208	Aceite final Nº 4 de PTA-10208	Aceite final Nº 5 de PTA-10208
Ácido graso	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME
C12:0	2,5	2,3	2,7	2,5	2,6
C14:0	16,3	15,1	21,3	18,6	18,1
C14:1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C15:0	3,9	3,6	4,4	4,0	4,0
C16:0	194,2	181,9	196,1	186,1	199,8
C16:1	0,4	0,4	0,6	0,5	0,7
C17:0	0,6	0,5	0,9	0,8	0,8
C18:0	12,9	14,2	11,7	12,5	13,2
C18:1 n-9	24,3	84,0	26,8	26,1	34,0
C18:1 n-7	0,1	0,7	0,1	0,1	0,3
C18:2 n-6	3,2	7,7	3,4	3,5	4,0
C20:0	4,4	4,2	3,8	4,0	4,2
C18:3 n-3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:1 n-9	<0,1	0,2	<0,1	<0,1	0,1
C18:4 n-3	2,5	2,4	2,8	2,6	2,7
C20:2 n-6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 n-6	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1
C22:0	1,2	1,9	1,0	1,1	1,1
C20:4 n-7	1,7	1,6	1,8	1,8	1,7
C20:3 n-3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 n-6	13,2	12,3	13,8	13,7	13,8
C22:1 n-9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 n-5	1,6	1,5	1,6	1,7	1,5
C20:4 n-3	6,1	5,7	6,1	5,9	6,2

ES 2 758 782 T3

	Aceite final Nº 1 de PTA-10208	Aceite final Nº 2 de PTA-10208	Aceite final Nº 3 de PTA-10208	Aceite final Nº 4 de PTA-10208	Aceite final Nº 5 de PTA-10208
Ácido graso	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME
C20:5 n-3	176,0	166,1	199,0	211,2	204,2
C24:0	1,2	1,3	1,0	1,1	1,2
C22:4 n-9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C24:1 n-9	3,3	3,2	2,2	2,5	2,4
C22:5 n-6	15,0	14,2	14,7	13,2	13,5
C22:5 n-3	44,4	42,0	33,3	40,5	38,3
C22:6 n-3	397,9	378,4	376,4	375,5	375,5
Suma de FAME	926,9	945,7	925,5	929,6	944,1

Tabla 45: Perfiles de ácidos grasos de TAG aislados: Aceites finales de PTA-10208 (%)

	Aceite final Nº 1 de PTA-10208	Aceite final Nº 2 de PTA-10208	Aceite final Nº 3 de PTA-10208	Aceite final Nº 4 de PTA-10208	Aceite final Nº 5 de PTA-10208
Ácido graso	% de FAME				
C12:0	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3
C14:0	1,8	1,6	0,3	0,3	0,3
C14:1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C15:0	0,4	0,4	0,5	0,4	0,4
C16:0	20,9	19,2	21,2	20,0	21,2
C16:1	<0,1	<0,1	0,1	0,1	0,1
C17:0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
C18:0	1,4	1,5	1,3	1,3	1,4
C18:1 n-9	2,6	8,9	2,9	2,8	3,6
C18:1 n-7	<0,1	0,1	<0,1	<0,1	<0,1
C18:2 n-6	0,3	0,8	0,4	0,4	0,4
C20:0	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4
C18:3 n-3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:1 n-9	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
C18:4 n-3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
C20:2 n-6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 n-6	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
C22:0	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1
C20:4 n-7	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
C20:3 n-3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

ES 2 758 782 T3

	Aceite final Nº 1 de PTA-10208	Aceite final Nº 2 de PTA-10208	Aceite final Nº 3 de PTA-10208	Aceite final Nº 4 de PTA-10208	Aceite final Nº 5 de PTA-10208
Ácido graso	% de FAME				
C20:4 n-6	1,4	1,3	1,5	1,5	1,5
C22:1 n-9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 n-5	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
C20:4 n-3	0,7	0,6	0,7	0,6	0,7
C20:5 n-3	19,0	17,6	21,5	22,7	21,6
C24:0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
C22:4 n-9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C24:1 n-9	0,4	0,3	0,2	0,3	0,3
C22:5 n-6	1,6	1,5	1,6	1,4	1,4
C22:5 n-3	4,8	4,4	3,6	4,4	4,1
C22:6 n-3	42,9	40,0	40,7	40,4	39,8

Tabla 46: Esteroles aislados/Perfiles de ácidos de grasos de DAG: Aceite final de PTA-10208 (mg/g)

	Aceite final Nº 1 de PTA-10208	Aceite final Nº 2 de PTA-10208	Aceite final Nº 3 de PTA-10208	Aceite final Nº 4 de PTA-10208	Aceite final Nº 5 de PTA-10208
Ácido graso	FAME (mg/g)				
C12:0	1,9	2,1	2,9	2,1	1,9
C14:0	9,9	9,5	9,7	10,3	8,0
C14:1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C15:0	2,4	2,3	2,2	2,3	2,0
C16:0	132,6	128,6	110,1	116,8	106,4
C16:1	0,2	0,3	<0,1	0,3	0,4
C17:0	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3
C18:0	7,3	8,1	6,4	6,8	6,1
C18:1 n-9	15,0	55,1	47,4	19,0	30,1
C18:1 n-7	0,4	0,7	0,1	<0,1	0,2
C18:2 n-6	13,1	16,7	21,6	13,5	18,4
C20:0	2,0	2,1	1,2	1,8	1,4
C18:3 n-3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:1 n-9	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
C18:4 n-3	2,3	2,4	2,4	2,4	2,0
C20:2 n-6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 n-6	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1

ES 2 758 782 T3

	Aceite final Nº 1 de PTA-10208	Aceite final Nº 2 de PTA-10208	Aceite final Nº 3 de PTA-10208	Aceite final Nº 4 de PTA-10208	Aceite final Nº 5 de PTA-10208
Ácido graso	FAME (mg/g)				
C22:0	0,6	1,0	0,5	0,6	0,5
C20:4 n-7	0,8	0,9	2,1	0,9	0,7
C20:3 n-3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 n-6	5,7	5,8	4,8	6,1	4,5
C22:1 n-9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 n-5	<0,1	<0,1	<0,1	0,6	<0,1
C20:4 n-3	2,7	2,7	2,1	2,7	2,0
C20:5 n-3	92,9	94,5	91,9	111,6	84,8
C24:0	1,2	1,3	1,1	1,1	1,3
C22:4 n-9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C24:1 n-9	1,9	2,0	1,2	1,5	1,2
C22:5 n-6	7,8	8,0	6,7	7,0	5,5
C22:3 n-3	22,2	22,9	13,9	20,7	14,2
C22:6 n-3	246,3	252,7	223,5	240,3	196,3
Suma de FAME	569,3	619,8	552,1	568,7	488,2

Tabla 47: Esteroles aislados/Perfiles ácidos grasos de DAG: Aceites finales de PTA-10208 (%)

	Aceite final Nº 1 de PTA-10208	Aceite final Nº 2 de PTA-10208	Aceite final Nº 3 de PTA-10208	Aceite final Nº 4 de PTA-10208	Aceite final Nº 5 de PTA-10208
Ácido graso	% de FAME				
C12:0	0,3	0,3	0,5	0,4	0,4
C14:0	1,7	1,5	1,8	1,8	1,6
C14:1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C15:0	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
C16:0	23,3	20,8	19,9	20,5	21,8
C16:1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0,1
C17:0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1
C18:0	1,3	1,3	1,2	1,2	1,2
C18:1 n-9	2,6	8,9	8,6	3,3	6,2
C18:1 n-7	0,1	0,1	<0,1	<0,1	<0,1
C18:2 n-6	2,3	2,7	3,9	2,4	3,8
C20:0	0,4	0,3	0,2	0,3	0,3
C18:3 n-3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

ES 2 758 782 T3

	Aceite final N° 1 de PTA-10208	Aceite final N° 2 de PTA-10208	Aceite final N° 3 de PTA-10208	Aceite final N° 4 de PTA-10208	Aceite final N° 5 de PTA-10208
Ácido graso	% de FAME				
C20:1 n-9	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
C18:4 n-3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
C20:2 n-6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 n-6	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
C22:0	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1
C20:4 n-7	0,1	0,1	0,4	0,2	0,1
C20:3 n-3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 n-6	1,0	0,9	0,9	1,1	0,9
C22:1 n-9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 n-5	<0,1	<0,1	<0,1	0,1	<0,1
C20:4 n-3	0,5	0,4	0,4	0,5	0,4
C20:5 n-3	16,3	15,2	16,6	19,6	17,4
C24:0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3
C22:4 n-9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C24:1 n-9	0,3	0,3	0,2	0,3	0,2
C22:5 n-6	1,4	1,3	1,2	1,2	1,1
C22:5 n-3	3,9	3,7	2,5	3,6	2,9
C22:6 n-3	43,3	40,8	40,5	42,3	40,2

Tabla 48: Separación de clases de lípidos por cromatografía ultrarrápida (% en peso)

Separación de clases de lípidos	Aceite final N° 1 de PTA-10208	Aceite final N° 2 de PTA-10208	Aceite final N° 3 de PTA-10208	Aceite final N° 4 de PTA-10208	Aceite final N° 5 de PTA-10208
TAG	93,4	95,4	94,0	95,7	95,1
Esteroles/DAG	3,1	2,9	2,6	3,0	2,9
Recuperación (%)	96,5	98,3	96,6	98,7	98,0

Tabla 49: Separación de clases de lípidos por HPLC-ELSD (% en peso)

	Ésteres de esteroles	TAG	FFA	Esteroles	1,3-DAG	1,2-DAG	MAG	Total
Aceite final N° 1 de PTA-10208	0,4	90,8	ND	0,8	0,5	0,5	N.D.	93,0
Aceite final N° 2 de PTA-10208	0,4	88,5	ND	0,6	0,6	0,6	N.D.	90,7

ES 2 758 782 T3

	Ésteres de esterol	TAG	FFA	Esteroles	1,3-DAG	1,2-DAG	MAG	Total
Aceite final Nº 3 de PTA-10208	0,3	89,4	ND	0,8	0,6	0,5	N.D.	91,6
Aceite final Nº 4 de PTA-10208	0,3	88,0	ND	0,8	0,5	0,5	N.D.	90,1
Aceite final Nº 5 de PTA-10208	0,3	86,3	ND	0,7	0,8	0,5	N.D.	88,6
Aceite final Nº 6 de PTA-10208	0,36	100,76	ND	0,84	0,54	0,61	N.D.	103,11
ND= No detectado								

Aceite final de PTA-10212

DHA estuvo presente en un aceite final de PTA-10212 a 41,63 % y 366,9 mg/g, mientras que EPA estuvo presente a 16,52 %. Se determinaron los perfiles de ácidos grasos individuales y se resumen en la Tabla 50.

5

Tabla 50: Perfiles de ácidos grasos del aceite final de PTA-10212 (% de FAME)

Ácido graso	% de FAME
C6:0	ND
C7:0	ND
C8:0	ND
C9:0	ND
C10:0	ND
C11:0	ND
C12:0	ND
C13:0	ND
C14:0	0,84
C14:1	ND
C15:0	1,33
C16:0	27,09
C16:1	1,03
C17:0	0,34
C17:1	ND
C18:0	1,26
C18:1 n-9	2,14
C18:1 n-7	0,18
C19:0	ND
C18:2 n-6	0,58
C20:0	0,32

Ácido graso	% de FAME
C18:3 n-3	ND
C20:1 n-9	ND
C18:3 n-6	ND
C20:2 n-6	0,26
C20:3 n-6	ND
C22:0	0,14
C20:3 n-3	ND
C20:4 n-6	1,34
C22:1 n-9	ND
C23:0	ND
C20:5 n-3	16,53
C24:0	0,53
C24:1 n-9	ND
C22:5 n-6	1,50
C22:5 n-3	1,30
C22:6 n-3	41,63
Desconocido	0,87
ND= No detectado	

Ejemplo 38

5 Se preparó un matraz de inóculo de dos días de edad de los microorganismos aislados depositados con los N° de acceso de ATCC PTA-10208 y 10212 como un cultivo alimentado con carbono y nitrógeno en medios según las Tablas 30 y 31.

Se llevó a cabo mutagénesis según el siguiente procedimiento:

10 Se vertió un matraz estéril de T=2 días de edad, aproximadamente 50 mL, en un homogeneizador estéril de vidrio de 40 mL. El cultivo recibió 50 emboladas en el homogeneizador. Se pipeteó el cultivo y se filtró a través de un filtro de malla estéril de 50 micrómetros, que se dispuso en un tubo estéril de 50 mL (la malla se usó como un medio de retención de grupos más grandes de colonias mientras se permitía que las agrupaciones más pequeñas y las células individuales pasaran a través de la malla de 50 micrómetros). Se recogió todo el lote de macerado concentrado en un tubo estéril de 50 mL. Se agitó con vórtex el cultivo macerado y se hicieron diluciones a niveles de hasta 1:100 veces. Se agitaron con vórtex las muestras maceradas diluidas antes de añadir 200 µL de inóculo a una placa de medio de agar, 100 x 15 mm, que contenía 4-5 perlas de vidrio (perlas de vidrio de 3 mm). Cada placa se agitó suavemente en un esfuerzo por que las perlas extiendan el inóculo uniformemente alrededor de la placa. Se tiraron las perlas de las placas y se dejó que las placas se asentaran con tapas encima durante aproximadamente 5 minutos para el secado. Se apagaron las luces en tanto la campana estéril como las áreas limítrofes ya que el procedimiento se realizó en luz tenue. Hubo luz mínima disponible para ser capaces de realizar el procedimiento pero solo indirecta y tenue.

20 Se dispusieron cinco placas por duplicado sobre la base del reticulador XL (Spectronics Corporation, Nueva York) con las tapas quitadas mientras que se irradiaron las muestras. El reticulador suministró potencia en términos de microjulios y se buscó un nivel que alcanzara una destrucción de 90 %-95 %. Se inocularon cinco placas de control por duplicado con células no mutagenizadas usando el mismo protocolo. Se usaron estas cifras de células para calcular el % de destrucción. Una vez terminó la irradiación, se sacaron las placas, se cambiaron las tapas, y se envolvieron las placas en parafilm seguido por una envoltura en lámina de aluminio. Fue fundamental que las placas crecieran hasta la primera semana en la oscuridad de manera que no fueran capaces de reparar los genes dañados.

25

ES 2 758 782 T3

Se dispusieron las placas en una sala a 22,5°C durante aproximadamente 10 días antes de contar las colonias. Cuando se hicieron los recuentos finales, se seleccionaron las colonias individuales con un bucle de inoculación estéril y se volvieron a extender sobre nuevas placas de medio. Se sembró cada colonia sobre una placa individual. A medida que las placas crecieron en densidad, se tomó una muestra, usando un bucle de inoculación, y se inocularon en un matraz oscilante estéril de 250 mL que contenía 50 mL de medio. Este matraz se dispuso en un agitador a 200 rpm en una sala de 22,5 °C. En T=7 días, se recogió el cultivo de matraz oscilante en un tubo estéril de 50 mL. Se tomó el pH y se centrifugó la muestra para recoger el sedimento de biomasa. Se aclaró cada muestra y se resuspendió en una mezcla 50:50 de alcohol isopropílico y agua destilada antes de ser nuevamente centrifugada. Se liofilizó el sedimento recogido, se pesó, y se realizó un análisis de FAME. Los datos en las Tablas 51 y 52 representan mutantes producidos con el proceso anterior de las cepas PTA-10208 y PTA-10212, respectivamente.

Tabla 51: Mutantes de PTA-10208

Ácidos grasos	PTA-10208 de control	Mutante 1 PTA-10209	Mutante 2 PTA-10210	Mutante 3 PTA-10211
% de 08:0	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 09:0	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 10:0	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 11:0	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 11:1	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 12:0	0,11	0,10	0,22	0,19
% de 12:1	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 13:0	0,19	0,19	0,15	0,16
% de 13:1	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 14:0	1,94	1,82	2,98	2,59
% de 14:1	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 15:1	2,66	2,22	1,76	1,66
% de 16:0	24,87	24,97	23,71	25,01
% de 16:1	0,20	0,25	0,07	0,07
% de 16:2	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 16:3	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 17:0	1,49	1,21	0,62	0,66
% de 18:0	1,13	1,14	0,91	1,01
% de 18:1 n-9	0,07	0,07	0,06	0,06
% de 18:1 n-7	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 18:2	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 18:3 n-6	0,00	0,00	0,05	0,04
% de 18:3 n-3	0,09	0,08	0,17	0,14
% de 18:4 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:0	0,31	0,33	0,24	0,30
% de 20:1 n-9	0,00	0,04	0,00	0,00

ES 2 758 782 T3

Ácidos grasos	PTA-10208 de control	Mutante 1 PTA-10209	Mutante 2 PTA-10210	Mutante 3 PTA-10211
% de 20:2	0,00	0,00	0,05	0,00
% de 20:3 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:3 n-6	0,12	0,13	0,08	0,04
% de 20:3 n-3	0,42	0,42	0,08	0,06
% de 20:4 ARA	0,68	0,67	1,44	1,11
% de 20:5 n-3 EPA	6,56	6,47	11,99	9,87
% de 22:0	0,07	0,07	0,06	0,07
% de 22:1	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 22:2	0,11	0,09	0,10	0,08
% de 22:3	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 22:4 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 22:5 n-6	2,32	2,36	2,36	2,36
% de 22:5 n-3	0,48	0,66	0,66	0,52
% de 22:6 n-3 DHA	51,58	52,27	48,17	49,35
% de 24:0	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 24:1	0,00	0,00	0,00	0,00
% de grasa	47,87	49,41	66,00	63,12
% de desconocido	4,61	4,45	4,07	4,64

Tabla 52: Mutantes de PTA-10212

Ácidos grasos	PTA-10212 de control	Mutante 1 PTA-10213	Mutante 2 PTA-10214	Mutante 3 PTA-10215
% de 08:0	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 09:0	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 10:0	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 11:0	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 11:1	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 12:0	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 12:1	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 13:0	0,00	0,00	0,21	0,20
% de 13:1	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 14:0	0,68	0,77	0,62	0,97
% de 14:1	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 15:1	0,00	0,00	0,00	0,00

ES 2 758 782 T3

Ácidos grasos	PTA-10212 de control	Mutante 1 PTA-10213	Mutante 2 PTA-10214	Mutante 3 PTA-10215
% de 16:0	17,36	19,94	15,27	23,61
% de 16:1	1,45	2,33	1,40	2,57
% de 16:2	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 16:3	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 17:0	0,20	0,21	0,18	0,27
% de 18:0	0,78	0,82	0,79	0,81
% de 18:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 18:1 n-7	0,18	0,27	0,20	0,19
% de 18:2	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 18:3 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 18:3 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 18:4 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:0	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:2	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:3 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:3 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 20:3 n-3	0,90	0,77	0,99	0,66
% de 20:4 ARA	1,43	1,32	1,65	0,72
% de 20:5 n-3 EPA	13,33	14,93	14,14	8,54
% de 22:0	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 22:1	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 22:2	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 22:3	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 22:4 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 22:5 n-6	2,39	1,95	2,59	2,18
% de 22:5 n-3	0,73	0,79	0,80	0,68
% de 22:6 n-3 DHA	59,18	54,31	59,89	56,39
% de 24:0	0,00	0,00	0,00	0,00
% de 24:1	0,00	0,00	0,00	0,00
% de grasa	45,69	38,08	42,88	48,48
% de desconocido	1,38	1,58	1,27	2,19

Ejemplo 39

Se calentaron dos caldos de células (aproximadamente 13,3 kg) que contenían células microbianas (*Schizochytrium*) hasta 60 °C en un fermentador de 20 litros. En fermentador tenía dos impulsores Rushton de 6 palas que tenían un diámetro de 15 cm. Se situó el impulsor superior en la marca de 12 litros y se situó el impulsor inferior 10 cm por debajo del impulsor superior. Se agitó continuamente el primer caldo de células a 307 centímetros/segundo. Se agitó continuamente el segundo caldo de células a 464 centímetros/segundo. Se añadieron enzimas (es decir, Alcalasa 2,4 L FG 0,5 %) a la biomasa de células para lisar las células y formar una composición de célula lisada emulsionada. Se trató la composición de célula lisada emulsionada primero con una base (NaOH, 250 kg de disolución al 50 % p/p) hasta que el pH de la composición de célula lisada fue desde 10,4 hasta 10,6. A continuación, se añadió una sal (NaCl sólido, en una cantidad de 2 %, en peso, de la composición de célula lisada) a la composición de célula lisada. Entonces se calentó la composición de célula lisada hasta una temperatura de 90 °C y se mantuvo a ese nivel de temperatura durante 20 horas. Se tomó una muestra de cada caldo de células y se ajustó el pH a 8,0 y se dispuso en tubos de ensayo de 50 mL. Se centrifugaron los tubos de ensayo y se midieron los datos de extracción del aceite. Los datos de extracción del aceite se proporcionan en la Tabla 53.

Tabla 53. Resultados de la prueba de extracción en tubos de 50 mL a pH 8,0.

307 centímetros/segundo			
Caldo húmedo probado para la extracción (g)	Masa de aceite recuperada (g)	% de rendimiento (aceite/caldo)	% de rendimiento (aceite/sólidos)*
49,990	3,881	7,76	27,81
50,814	2,747	5,41	19,36
50,772	2,418	4,76	17,05
464 centímetros/segundo			
Caldo húmedo probado para la extracción (g)	Masa de aceite recuperada (g)	% de rendimiento (aceite/caldo)	% de rendimiento (aceite/sólidos)*
51,154	7,067	13,81	49,13
51,092	7,055	13,81	49,11
50,132	6,606	13,18	46,86
*basado en el contenido de sólidos de caldo pasteurizado sin tratar			

Los datos proporcionados en la Tabla 53 demuestran que la mayor velocidad de agitación produjo una mayor masa de aceite recuperada, un mayor % de rendimiento de aceite del caldo, y un mayor % de rendimiento de aceite del contenido de sólidos del caldo pasteurizado sin tratar.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso de obtención de un lípido de una célula microbiana, comprendiendo dicho proceso:
 - a) lisar una célula para formar una composición de célula lisada;
 - 5 b) añadir una base a la composición de célula lisada, aumentar el pH de la composición de célula lisada hasta 8 o por encima para desemulsionar la composición de célula;
 - c) uno o más de c1, c2, c3 y c4;
 - c1) añadir una sal a la composición de célula lisada hasta desemulsionar la composición de célula
 - c2) calentar la composición de célula lisada hasta desemulsionar la composición de célula
 - c3) agitar la composición de célula lisada hasta desemulsionar la composición de célula
 - 10 c4) añadir una segunda base a la composición de célula lisada hasta desemulsionar la composición de célula;
 - y
 - d) separar un lípido de la composición de célula desemulsionada;

en donde el lípido contiene menos de 5 % en peso de un disolvente orgánico.
- 15 2. El proceso según la reivindicación 1, en donde el proceso comprende añadir una sal a la composición de célula lisada hasta desemulsionar la composición de célula.
3. El proceso de la reivindicación 2, en donde la sal se añade en una cantidad de 0,1 % a 20 % en peso de la composición de célula lisada.
4. El proceso de la reivindicación 2 o 3, en donde la sal se selecciona del grupo que consiste en: sales de metales alcalinos, sales de metales alcalinotérreos, sales de sulfato, y combinaciones de los mismos.
- 20 5. El proceso según cualquier reivindicación precedente, en donde el proceso comprende calentar la composición de célula lisada hasta desemulsionar la composición de célula.
6. El proceso según la reivindicación 5, en donde el calentamiento se realiza después de la adición de una sal.
7. El proceso según cualquier reivindicación precedente, en donde el proceso comprende agitar la composición de célula lisada hasta desemulsionar la composición de célula.
- 25 8. El proceso de cualquier reivindicación precedente, en donde el aumento del pH de la composición de célula lisada se realiza después de la adición de una sal o el calentamiento.
9. El proceso de cualquier reivindicación precedente, en donde el proceso comprende agitar la composición de célula lisada removiendo, mezclando, combinando, agitando, vibrando, o una combinación de los mismos.
- 30 10. El proceso de cualquier reivindicación precedente, en donde el lisado comprende tratamiento mecánico, tratamiento físico, tratamiento químico, tratamiento enzimático, o una combinación de los mismos.
11. El proceso de cualquier reivindicación precedente, en donde la separación comprende centrifugar.
12. El proceso de cualquier reivindicación precedente, en donde el proceso proporciona un lípido que tiene un valor de anisidina de 26 o menos.
- 35 13. El proceso de cualquier reivindicación precedente, que comprende además refinar el lípido.
14. El proceso de la reivindicación 13, en donde el refinado se selecciona del grupo que consiste en: refinado, desengomado, tratamiento con ácido, tratamiento con álcali, enfriamiento, calentamiento, blanqueamiento, desodorización, desacidificación, y combinaciones de los mismos.
15. El proceso de cualquier reivindicación precedente, en donde la célula microbiana es un alga, bacteria, hongo, protista, o combinación de los mismos.
- 40 16. El proceso de la reivindicación 15, en donde la célula microbiana es un miembro del orden Thraustochytriales.
17. El proceso de la reivindicación 16, en donde la célula microbiana es del género *Thraustochytrium*, *Schizochytrium*, o mezclas de los mismos.
18. El proceso de cualquier reivindicación precedente, en donde el lípido comprende uno o más ácidos grasos poliinsaturados.
- 45

100

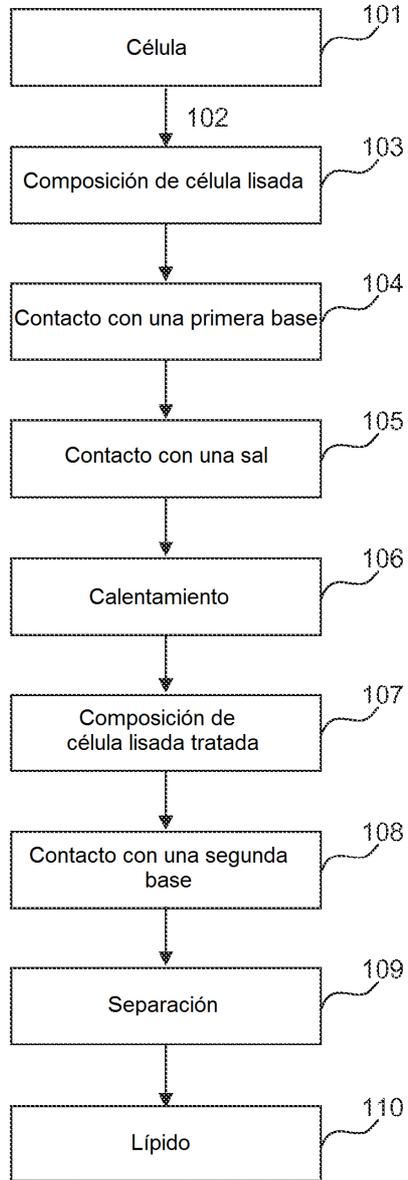


FIG. 1

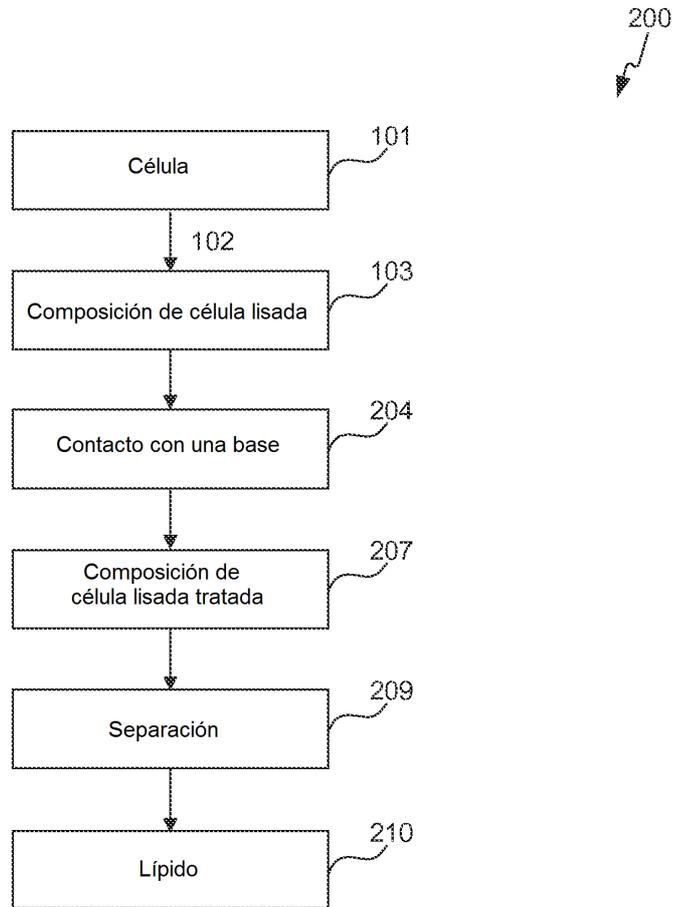


FIG. 2

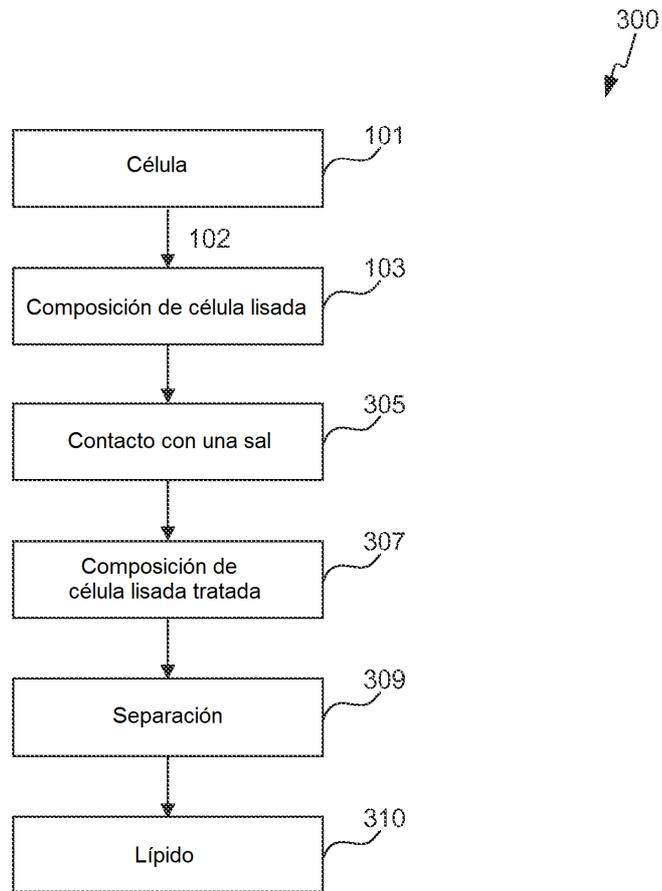


FIG. 3

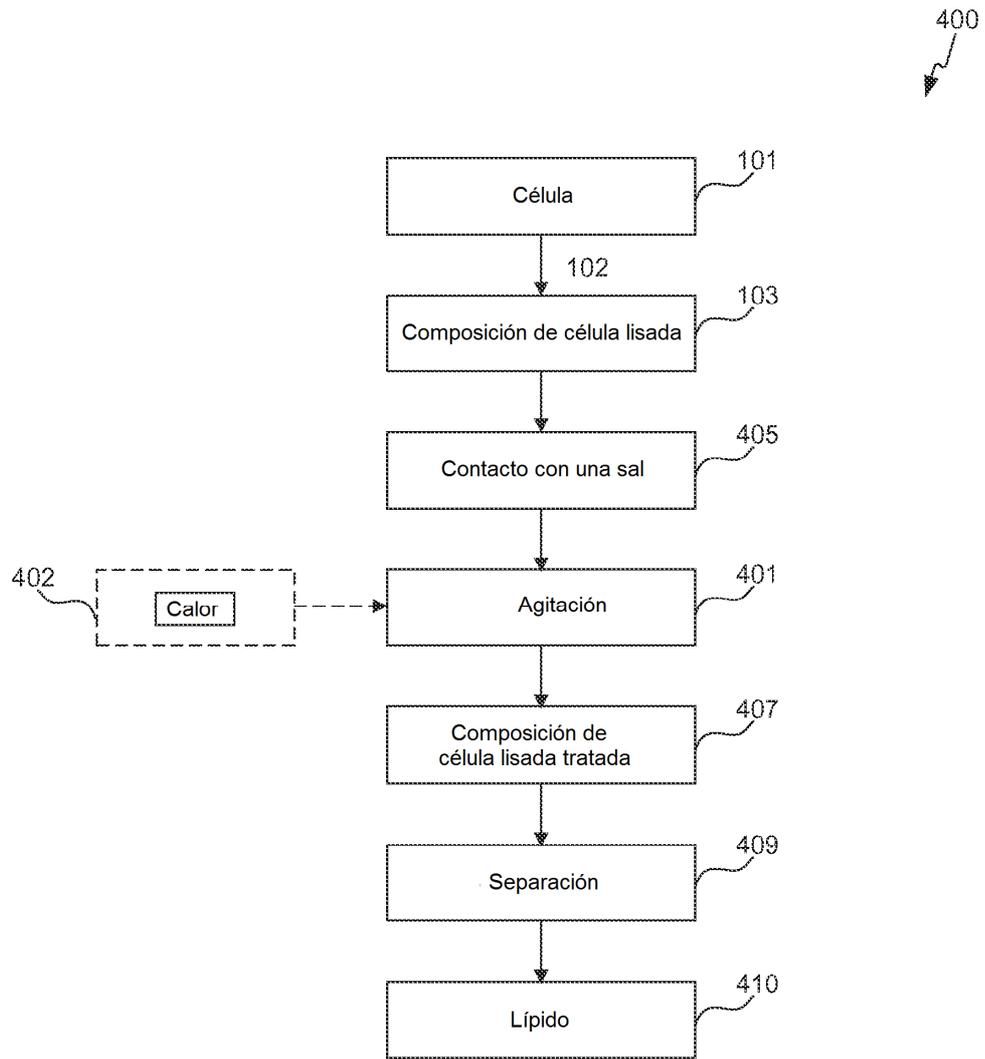


FIG. 4

Efecto del tratamiento alcalino usando espectroscopía de EPR

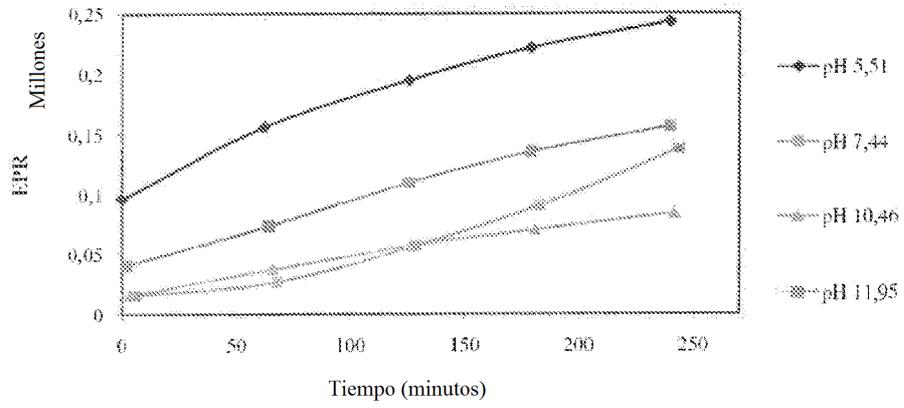


FIG. 5