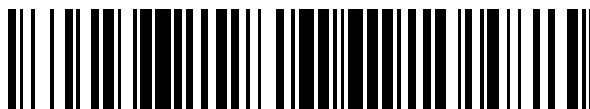


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 778**

51 Int. Cl.:

C12P 7/64

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.07.2012 PCT/US2012/047728**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.01.2013 WO13013208**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.07.2012 E 12815192 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019 EP 2734630**

54 Título: **Microorganismos productores de ácido eicosapentaenoico, composiciones de ácidos grasos y métodos de elaboración y usos de los mismos**

30 Prioridad:

21.07.2011 US 201161510464 P

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

22.07.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**PFEIFER, III, JOSEPH W.;
HANSEN, JON MILTON;
DONG, XIAO DANIEL;
BEHRENS, PAUL WARREN;
APT, KIRK E. y
GARCIA, JOSE R.**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 774 778 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

Microorganismos productores de ácido eicosapentaenoico, composiciones de ácidos grasos y métodos de elaboración y usos de los mismos

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 Campo de la Invención

La presente invención se dirige a métodos para producir aceites microbianos y métodos para producir biomásas.

Técnica Anterior

- Los ácidos grasos se clasifican basándose en la longitud y las características de saturación de la cadena de carbonos. Los ácidos grasos se denominan ácidos grasos de cadena corta, cadena media o cadena larga basándose en el número de carbonos presente en la cadena, se denominan ácidos grasos saturados cuando no están presentes dobles enlaces entre los átomos de carbono y se denominan ácidos grasos insaturados cuando están presentes dobles enlaces. Los ácidos grasos de cadena larga insaturados son monoinsaturados cuando solo está presente un doble enlace y son poliinsaturados cuando está presente más de un doble enlace.
- Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) se clasifican basándose en la posición del primer doble enlace desde el extremo metílico del ácido graso: los ácidos grasos omega-3 (n-3) contienen un primer doble enlace en el tercer carbono, mientras que los ácidos grasos omega-6 (n-6) contienen un primer doble enlace en el sexto carbono. Por ejemplo, el ácido docosahexaenoico ("DHA") es un ácido graso poliinsaturado de cadena larga (LC-PUFA) omega-3 con una longitud de cadena de 22 carbonos y 6 dobles enlaces, a menudo denominado "22:6 n-3." Otros LC-PUFAs omega-3 incluyen ácido eicosapentaenoico ("EPA"), denominado "20:5 n-3", y ácido docosapentaenoico omega-3 ("DPA n-3"), denominado "22:5 n-3". El DHA y el EPA se han llamado ácidos grasos "esenciales". LC-PUFAs omega-6 incluyen ácido araquidónico ("ARA"), denominado "20:4 n-6", y ácido docosapentaenoico omega-6 ("DPA n-6"), denominado "22:5 n-6".
- Los ácidos grasos omega-3 son moléculas biológicamente importantes que afectan a la fisiología celular debido a su presencia en membranas celulares, regulan la producción y la expresión génica de compuestos biológicamente activos y sirven como sustratos biosintéticos. Roche, H. M., *Proc. Nutr. Soc.* 58: 397-401 (1999). El DHA, por ejemplo, representa aproximadamente 15%-20% de los lípidos de la corteza cerebral humana, 30%-60% de los lípidos de la retina, se concentra en los testículos y el esperma y es un componente importante de la leche materna. Berge, J.P. y Barnathan, G., *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 96:49-125 (2005). El DHA representa hasta 97% de los ácidos grasos omega-3 del cerebro y hasta 93% de los ácidos grasos omega-3 de la retina. Por otra parte, el DHA es esencial para el desarrollo tanto fetal como neonatal así como el mantenimiento de las funciones cognitivas en adultos. *Id.* Debido a que los ácidos grasos omega-3 no se sintetizan de novo en el cuerpo humano, estos ácidos grasos se deben derivar de fuentes nutricionales.
- El aceite de linaza y los aceites de pescado se consideran buenas fuentes dietéticas de ácidos grasos omega-3. El aceite de linaza no contiene EPA, DHA, DPA ni ARA, pero en cambio contiene ácido linolénico (C18:3 n-3), una unidad estructural que permite que el cuerpo fabrique EPA. Sin embargo, existe evidencia de que la velocidad de conversión metabólica puede ser lenta y variable, particularmente entre los que tienen una salud deteriorada. Los aceites de pescado varían considerablemente en el tipo y el nivel de composición de ácidos grasos dependiendo de la especie particular y sus dietas. Por ejemplo, el pescado producido por piscicultura tiende a tener un nivel inferior de ácidos grasos omega-3 que el salvaje. Por otra parte, los aceites de pescado tienen el riesgo de contener contaminantes ambientales y pueden estar asociados con problemas de estabilidad y un olor o sabor a pescado.
- Los traustochytridos son microorganismos del orden Thraustochytriales. Los traustochytridos incluyen miembros del género *Schizochytrium* y *Thraustochytrium* y se han identificado como una fuente alternativa de ácidos grasos omega-3, incluyendo DHA y EPA. Véase la Patente de EE. UU. Nº 5.130.242. A menudo, los aceites producidos a partir de estos microorganismos heterotróficos marinos tienen perfiles de ácidos grasos poliinsaturados más simples que los correspondientes aceites de pescado o microalgas. Lewis, T.E., *Mar. Biotechnol.* 1: 580-587 (1999). Se ha identificado que cepas de especies de traustochytridos producen ácidos grasos omega-3 como un alto porcentaje de los ácidos grasos totales producidos por los organismos. Patente de EE. UU. Nº 5.130.242; Huang, J. y cols., *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 78: 605-610 (2001); Huang, J. y cols., *Mar. Biotechnol.* 5: 450-457 (2003). Sin embargo, los traustochytridos aislados varían en la identidad y las cantidades de LC-PUFAs producidos, de modo que algunas cepas descritas previamente pueden tener niveles indeseables de ácidos grasos omega-6 y/o pueden demostrar baja productividad en cultivo. Como tal, existe una necesidad vigente de aislar microorganismos que muestren alta productividad y perfiles de LC-PUFA deseables.

HOSHIDA y cols., Accumulation of eicosapentaic acid in *Nannochloropsis* sp. in response to elevated CO₂ concentrations. *J Appl Phycol.* Enero de 2005, Vol. 17, Nº 1, páginas 29-34, ISSN 1573-5176, presentan el efecto de la concentración de CO₂ sobre el contenido de ácido eicosapentaenoico en el alga marina *Nannochloropsis* sp.. Hoshida y cols. muestran que incrementar la concentración de CO₂ hasta 0,3% y 2% a lo largo de 1,5 días retenía el contenido de EPA por célula en una concentración superior durante 1 y 2 días, respectivamente. Se obtenía una producción máxima de EPA cuando se suministraba CO₂ al 2% 12 h antes del final del desarrollo exponencial.

YONGMANITCHAI y WARD, Growth of and Omega-3 Fatty Acid Production by *Phaeodactylum tricornutum* under Different Culture Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* Febrero de 1991, Vol. 57, Nº 2, páginas 419-425, ISSN 0099-2244, presentan el efecto de la complementación con CO₂ sobre la producción de EPA por *P. tricornutum* en el intervalo de CO₂ al 0,1-1,5% (vol/vol). Yongmanitchai y Ward presentan que la producción máxima de EPA se observaba con CO₂ al 1%, sin embargo, a una concentración incrementada, la producción de EPA estaba por debajo del control.

BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

Los solicitantes han encontrado que la cantidad de EPA y DHA, producidos por un traustóquitrido que produce una biomasa que tiene al menos 3% de EPA, se puede modular al variar las cantidades de dióxido de carbono (CO₂) disuelto en una fase acuosa de un caldo de fermentación durante la fermentación del microorganismo.

La invención proporciona un método para elaborar una biomasa según la reivindicación 1.

Se divulga además en la presente un método para elaborar una biomasa de un microorganismo que tiene ácidos grasos y una concentración de EPA, que comprende: fermentar el microorganismo en un recipiente fermentador, que comprende un gas, para producir una biomasa, en donde el microorganismo comprende un traustóquitrido que produce una biomasa que tiene al menos 3% de EPA del peso total de los ácidos grasos; y complementar el gas con CO₂. Complementar significa añadir a o cargar los recipientes con CO₂ en una cantidad adicional a la cantidad producida por la fermentación de las células o una cantidad en condiciones ambientales. En una realización, el CO₂ se complementa al recipiente para alcanzar una cantidad deseada de EPA y/o DHA en la biomasa.

También se divulga en la presente un método para elaborar una biomasa de un microorganismo que tiene ácidos grasos y una concentración de EPA, que comprende: fermentar el microorganismo en un recipiente fermentador para producir una biomasa, en donde el microorganismo comprende un traustóquitrido que produce una biomasa que tiene al menos 3% de EPA del peso total de los ácidos grasos; y ajustar la cantidad de la biomasa en el recipiente. En una realización de la divulgación, la biomasa se ajusta para alcanzar una cantidad deseada de EPA y/o DHA en la biomasa.

También se divulga un método para elaborar un microorganismo que tiene ácidos grasos y una concentración de EPA, que comprende: fermentar el microorganismo en un recipiente fermentador para producir una biomasa, en donde el microorganismo comprende un traustóquitrido que produce una biomasa que tiene al menos 3% de EPA del peso total de los ácidos grasos; y ajustar la presión sobre la biomasa, por ejemplo, pero no limitado a, controlar la contrapresión del recipiente. En una realización, la presión se ajusta para alcanzar una cantidad deseada de EPA y/o DHA en la biomasa.

En otra realización divulgada en la presente, está un método para elaborar un microorganismo que tiene ácidos grasos y una concentración de EPA, que comprende: fermentar el microorganismo en un recipiente fermentador para producir un caldo de fermentación y una biomasa, en donde el microorganismo comprende un traustóquitrido que produce una biomasa que tiene al menos 3% de EPA del peso total de los ácidos grasos; y ajustar la temperatura en el caldo. En una realización, la temperatura se ajusta para alcanzar un nivel deseado de EPA y/o DHA en la biomasa.

En diversas realizaciones, las cantidades de EPA y DHA también se pueden modular al ajustar la cantidad de CO₂ disuelto en una fase acuosa o un caldo de fermentación del recipiente al incrementar o reducir la cantidad de CO₂ en el recipiente. La cantidad de CO₂ disuelto se puede ajustar al ajustar adicionalmente la cantidad de la biomasa fermentada. Por ejemplo, al fermentar las células en matraces y recipientes de fermentación más grandes. El EPA y el DHA también se pueden variar según realizaciones proporcionadas en la presente al variar la temperatura. La cantidad de CO₂ disuelto se puede ajustar adicionalmente, por ejemplo, al ajustar la temperatura en el recipiente. Por ejemplo, temperaturas del recipiente inferiores producirán concentraciones superiores de EPA y concentraciones inferiores de DHA. La cantidad de CO₂ disuelto se puede ajustar adicionalmente al ajustar la presión en el recipiente. Por ejemplo, incrementar la presión incrementará asimismo el CO₂ disuelto, lo que incrementará la cantidad de EPA y reducirá la cantidad de DHA en la biomasa. Cada uno de los ajustes descritos anteriormente, p. ej., CO₂ complementado, incremento o reducción en la biomasa, incremento o reducción en la temperatura o incremento o reducción en la presión, se puede combinar con cualquiera de los otros ajustes para alcanzar un nivel deseado de EPA y DHA en la biomasa y cualquier aceite extraído de la biomasa. El CO₂ disuelto también se puede ajustar mediante un cambio en el pH.

En algunas realizaciones, la cantidad total de EPA y DHA permanece relativamente constante en comparación con la cantidad, en peso, del peso total de los ácidos grasos y ácidos grasos omega-3.

5 En realizaciones adicionales, el contenido de EPA o DHA de la biomasa se mide antes de realizar un ajuste en la cantidad del CO₂ complementado, la presión, la temperatura o la biomasa.

10 Aunque sin querer limitarse por ninguna teoría, se establece como hipótesis que el incremento y la reducción en las cantidades del EPA o DHA está relacionado directamente con la cantidad de CO₂ disuelto en la fase acuosa del caldo de fermentación y que los ajustes descritos anteriormente de CO₂, de presión y de temperatura varían la cantidad de CO₂ disuelto en la biomasa.

15 En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un método para elaborar una biomasa de un microorganismo que tiene una concentración incrementada de EPA, comprendiendo el método desarrollar el microorganismo en un medio de cultivo que comprende menos de 0,1 mg/l de vitamina B12 para producir una biomasa. En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende menos de 0,01 mg/l de vitamina B12. En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende menos de 0,001 mg/l de vitamina B12. En realizaciones adicionales, el medio de cultivo comprende menos de 0,0001 mg/l de vitamina B12. En algunas realizaciones, el medio de cultivo no contiene vitamina B12.

20 En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende además menos de 1 g de extracto de levadura por 50 g de biomasa libre de lípidos. En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende además menos de 0,5 g de extracto de levadura por 50 g de biomasa libre de lípidos. En realizaciones adicionales, el medio de cultivo comprende además menos de 0,1 g de extracto de levadura por 50 g de biomasa libre de lípidos.

25 En algunas realizaciones, la concentración de EPA se incrementa en al menos 400% en comparación con la concentración de EPA en una biomasa obtenida a partir del microorganismo desarrollado en un medio de cultivo que comprende más de 0,1 mg/l de vitamina B12. En algunas realizaciones, la concentración de EPA se incrementa en al menos 300% en comparación con la concentración de EPA en una biomasa procedente de un microorganismo desarrollado en un medio de cultivo que comprende más de 0,01 mg/l de vitamina B12. En realizaciones adicionales, la concentración de EPA se incrementa en al menos 200% en comparación con la concentración de EPA en una biomasa procedente de un microorganismo desarrollado en un medio de cultivo que comprende más de 0,001 mg/l de vitamina B12. En algunas realizaciones, la concentración de EPA se incrementa en al menos 100% en comparación con la concentración de EPA en una biomasa procedente de un microorganismo desarrollado en un medio de cultivo que comprende más de 0,0001 mg/l de vitamina B12.

35 Se divulga además un método para elaborar una biomasa de un microorganismo que tiene una concentración incrementada de EPA, que comprende desarrollar el microorganismo en un medio de cultivo que comprende menos de 0,1 mg/l de cobalto para producir una biomasa. En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende menos de 0,01 mg/l de cobalto. En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende menos de 0,001 mg/l de cobalto. En realizaciones adicionales, el medio de cultivo comprende menos de 0,0001 mg/l de cobalto. En algunas realizaciones, el medio de cultivo no contiene cobalto.

45 El microorganismo es un traustokitrido. El microorganismo produce al menos 3% de EPA del peso total de los ácidos grasos.

En algunas realizaciones, el medio de cultivo tiene un nivel de CO₂ disuelto de al menos 5%. En realizaciones adicionales, el medio de cultivo tiene un nivel de CO₂ disuelto de al menos 10%. En algunas realizaciones, el medio de cultivo tiene un nivel de CO₂ disuelto de al menos 15%.

50 Se divulga además una biomasa aislada y un aceite microbiano extraído de la biomasa de cualquier de los métodos de la presente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las diversas realizaciones de la invención se pueden entender más a fondo a partir de la siguiente descripción detallada, las figuras y las descripciones de secuencias adjuntas, que forman parte de esta solicitud.

55 La FIG. 1 muestra el comportamiento de PTA-9695 en un gradiente de tiamina.

La FIG. 2 muestra el comportamiento de PTA-9695 en un gradiente de vitamina B12.

La FIG. 3 muestra el comportamiento de PTA-9695 en un gradiente de biotina.

La FIG. 4 muestra el comportamiento de PTA-9695 en un gradiente de pantotenato Ca.

La FIG. 5 muestra el comportamiento de PTA-9695 en patrones de TSFM.

Las FIG. 6 - FIG. 19 muestran el comportamiento de PTA-9695 en un gradiente de vitamina B12 con CO₂ al 10%.

Las FIG. 20 - FIG. 49 muestran el comportamiento de PTA-10208 en un gradiente de vitamina B12 con CO₂ al 10%.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5 Los métodos y las composiciones proporcionados en la presente son particularmente aplicables a un traustokuitrido que produce una biomasa que tiene al menos 3% de EPA del peso total de los ácidos grasos que produce. Un traustokuitrido particular que produce una biomasa que tiene al menos 3% de EPA proporcionado en la presente es un microorganismo aislado de la especie depositada bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-10212. El microorganismo aislado asociado con el N° de Registro de la ATCC PTA-10212 fue depositado bajo el Tratado de Budapest el 14 de julio de 2009 en the American Type Culture Collection, Patent Depository, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209.

10 Un traustokuitrido particular que produce una biomasa que tiene al menos 3% de EPA se selecciona de un microorganismo aislado depositado bajo los N° de Registro de la ATCC PTA-10212, PTA-10213, PTA-10214, PTA-10215, PTA-10208, PTA-10209, PTA-10210 o PTA-10211.

15 Una realización particular proporcionada en la presente se dirige a un microorganismo aislado que comprende un ARNr 18s que comprende una secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO:1 o una secuencia polinucleotídica que tiene al menos 94% de identidad con SEQ ID NO:1.

20 Una realización particular proporcionada en la presente se dirige a un microorganismo aislado que comprende una secuencia polinucleotídica de ARNr 18s que tiene al menos 94% de identidad con una secuencia polinucleotídica de ARNr 18s del microorganismo depositado bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-10212.

25 Un traustokuitrido particular que produce una biomasa que tiene al menos 3% de EPA proporcionado en la presente se dirige a un microorganismo aislado de la especie depositada bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-10208

30 Una realización particular proporcionada en la presente se dirige a un microorganismo aislado de la especie depositada bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-10208, en donde los ácidos grasos totales producidos por el microorganismo comprenden más de alrededor de 10% en peso de ácido eicosapentaenoico.

35 Un traustokuitrido particular que produce una biomasa que tiene al menos 3% de EPA de la presente invención se dirige a un microorganismo aislado que tiene las características de la especie depositada bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-10208, en donde los ácidos grasos totales producidos por el microorganismo comprenden más de alrededor de 10% en peso de ácido eicosapentaenoico. Un traustokuitrido particular que produce una biomasa que tiene al menos 3% de EPA proporcionado en la presente se selecciona de un microorganismo aislado seleccionado de una cepa mutante depositada bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-10209, PTA-10210 o PTA-10211. Los microorganismos asociados con los N° de Registro de la ATCC PTA-10209, PTA-10210, y PTA-10211 fueron depositados bajo el Tratado de Budapest el 25 de septiembre de 2009 en the American Type Culture Collection, Patent Depository, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209.

40 Realizaciones proporcionadas en la presente se dirigen a los microorganismos descritos, anteriormente, y sus cepas mutantes, y los microorganismos identificados en la Solicitud de Patente de EE. UU. N° 12/729.013.

45 Una realización proporcionada en la presente se dirige a un microorganismo aislado que produce una fracción de triacilglicérol, en donde el contenido de ácido eicosapentaenoico de la fracción de triacilglicérol es al menos alrededor de 12% en peso.

50 Una realización proporcionada en la presente se dirige a una biomasa aislada, en donde al menos alrededor de 20% en peso de un peso celular seco de la biomasa son ácidos grasos, en donde más de alrededor de 10% en peso de ácidos grasos es ácido eicosapentaenoico y en donde los ácidos grasos comprenden menos de alrededor de 5% en peso de cada uno de ácido araquidónico y ácido docosapentaenoico n-6. En algunas realizaciones, al menos alrededor de 25% en peso de los ácidos grasos es ácido docosahexaenoico.

55 En algunas realizaciones, la presente divulgación se dirige a una biomasa aislada que comprende triacilglicérol, en donde al menos alrededor de 12% en peso del triacilglicérol es ácido eicosapentaenoico.

60 En algunas realizaciones, la presente divulgación se dirige a cualquiera de las biomásas aisladas de la invención, en donde los ácidos grasos comprenden además menos de alrededor de 5% en peso de cada uno de ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido eicosenoico y ácido erúico.

La presente divulgación también se dirige a un microorganismo traustokitrido aislado de la especie de traustokitrido depositada bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-9695 o una cepa derivada del mismo, en donde los ácidos grasos totales producidos por dicho microorganismo o cepa derivada del mismo comprenden alrededor de 10% en peso o menos de ácido eicosapentaenoico. Una realización proporcionada en la presente se dirige al microorganismo descrito anteriormente o una cepa procedente del mismo y otro microorganismo relacionado descrito en la Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. N° US 2010/0239533 incorporada mediante referencia en su totalidad.

También se proporciona en la presente un método para incrementar la concentración de EPA en una biomasa de un microorganismo que tiene ácidos grasos y una concentración de EPA, que comprende: fermentar el microorganismo en un recipiente fermentador, que comprende un gas, para producir una biomasa, en donde el microorganismo comprende un traustokitrido que produce una biomasa que tiene al menos 3% de EPA del peso total de los ácidos grasos; y complementar el gas con CO₂ en una cantidad suficiente para incrementar la concentración del EPA en la biomasa. El incremento en la concentración del EPA se puede comparar, por ejemplo, con la concentración de EPA de un microorganismo fermentado de forma similar no complementado con CO₂ o cuando se compara con un microorganismo fermentado de forma similar en condiciones ambientales.

En otra realización, la cantidad de CO₂ suficiente para incrementar la concentración del EPA es mayor de o igual a 2% del gas total del recipiente. En otra realización, la cantidad del CO₂ en el recipiente es mayor de o igual a alrededor de 5% hasta alrededor de 20% del gas total en el recipiente. En otra realización, la cantidad del CO₂ en el recipiente es mayor de o igual a alrededor de 5% hasta alrededor de 15% del gas total en el recipiente.

En una realización adicional, la cantidad de CO₂ complementada es mayor de o igual a 2% del gas total en el recipiente para incrementar la concentración del EPA en la biomasa hasta más de alrededor de 4%, en peso, del peso total de los ácidos grasos, más particularmente de alrededor de más de 4% hasta alrededor de 45%, en peso, del peso total de los ácidos grasos, más particularmente, de alrededor de más de 4% hasta alrededor de 40% del peso total de los ácidos grasos.

En una realización adicional, la cantidad de CO₂ complementada es suficiente para incrementar los niveles de EPA de alrededor de 4% hasta un intervalo de alrededor de 6 a 30%, en peso, del peso total de los ácidos grasos. En otra realización, la cantidad de CO₂ proporcionada es suficiente para incrementar la concentración del EPA desde alrededor de 15% hasta alrededor de 40%, en peso del peso total de los ácidos grasos. En otra realización, la cantidad de CO₂ proporcionada es suficiente para incrementar la concentración del EPA hasta más de 20%, en peso, del peso total de los ácidos grasos. En otra realización, el CO₂ se proporciona en una cantidad suficiente para incrementar la concentración del EPA desde alrededor de 20% hasta alrededor de 25%.

En otra realización, se proporciona en la presente un método para incrementar la concentración de EPA en una biomasa de un microorganismo que tiene ácidos grasos y una concentración de EPA, que comprende: fermentar el microorganismo en un recipiente fermentador para producir una biomasa; proporcionar una presión sobre la biomasa suficiente para incrementar la concentración del EPA en la biomasa. El incremento en la concentración del EPA se puede comparar, por ejemplo, con la concentración de EPA de un microorganismo fermentado de forma similar no provisto de la presión o cuando se compara con un microorganismo fermentado de forma similar en condiciones ambientales. En una realización adicional, la presión proporcionada sobre la biomasa está alrededor de 3447 Pa (0,5 psi) por encima de la presión atmosférica. En otra realización, el recipiente tiene una presión (o contrapresión) superior de más de o igual a alrededor de 2758 Pa (0,4 psi), más particularmente de alrededor de 2758 Pa (0,4 psi) hasta alrededor de 206.843 Pa (30 psi), aún más particularmente de alrededor de 6895 hasta alrededor de 206.843 Pa (de 1 a 30 psi). En otra realización, el recipiente tiene una presión superior de alrededor de 6895 hasta alrededor de 137.895 Pa (1 hasta alrededor de 20 PSI). En otra realización, la presión proporcionada se proporciona durante un tiempo suficiente para ajustar la cantidad de EPA en la biomasa, particularmente durante un tiempo de hasta 120 horas.

En otra realización proporcionada en la presente, está un método para elaborar una biomasa de un microorganismo que produce ácidos grasos y una concentración de EPA, que comprende fermentar el microorganismo en un recipiente fermentador para producir una biomasa, en donde el microorganismo comprende un traustokitrido que produce una biomasa que tiene al menos 3% de EPA del peso total de los ácidos grasos a una temperatura suficiente para incrementar la concentración del EPA en la biomasa. En algunas realizaciones, la temperatura suficiente para incrementar los niveles de EPA es menor de alrededor de 30 °C, más particularmente es menor de o igual a alrededor de 22 °C, y más particularmente la temperatura es menor de o igual a alrededor de 21°C. El incremento en la concentración del EPA se puede comparar, por ejemplo, con la concentración de EPA en un microorganismo fermentado de forma similar en el que la temperatura no se ajusta o cuando se compara con un microorganismo fermentado de forma similar en condiciones ambientales.

En una realización adicional, los métodos proporcionados en la presente varían las cantidades de EPA generadas durante la fermentación para producir una biomasa, y un aceite extraído, en donde la cantidad de EPA proporcionada es mayor de 4%, particularmente de alrededor de más 4% hasta alrededor de 45%, más particularmente de alrededor

de más de 4% hasta alrededor de 40% en peso, del peso total de los ácidos grasos. En otra realización, la cantidad de EPA producida por un método proporcionado en la presente está en una cantidad de alrededor de 6% hasta alrededor de 30% en peso del peso total de los ácidos grasos. En una realización adicional, la cantidad de EPA producida por un método proporcionado en la presente está en una cantidad de alrededor de 15% hasta alrededor de 40% en peso del peso total de los ácidos grasos. En una realización adicional, la cantidad de EPA producida por un método proporcionado en la presente está en una cantidad de más de alrededor de 20%, más particularmente de alrededor de 20% hasta alrededor de 25% en peso del peso total de los ácidos grasos.

En una realización adicional, el nivel deseado de EPA proporcionado es mayor de 4%, particularmente de alrededor de más de 4% hasta alrededor de 45%, más particularmente de alrededor de más de 4% hasta alrededor de 40% en peso, del peso total de los ácidos grasos. En otra realización, el nivel deseado de EPA producido por un método proporcionado en la presente está en una cantidad de alrededor de 6% hasta alrededor de 30% en peso del peso total de los ácidos grasos. En una realización adicional, el nivel deseado de EPA producido por un método proporcionado en la presente está en una cantidad de alrededor de 15% hasta alrededor de 40% en peso del peso total de los ácidos grasos. En una realización adicional, el nivel deseado de EPA producido por un método proporcionado en la presente está en una cantidad de más de alrededor de 20%, más particularmente de alrededor de 20% hasta alrededor de 25% en peso del peso total de los ácidos grasos.

Se divulga un método para incrementar la concentración de EPA en una biomasa de un microorganismo que tiene ácidos grasos y una concentración de EPA, que comprende: fermentar el microorganismo en un recipiente fermentador para producir una biomasa, en donde el microorganismo es un traustóquitrido que produce una biomasa que tiene al menos 3% de EPA del peso total de los ácidos grasos; e incrementar la biomasa en una cantidad suficiente para incrementar la concentración del EPA en la biomasa. En algunas realizaciones, la cantidad de biomasa suficiente para incrementar la concentración del EPA tiene una densidad de más de o igual a 10 g/l. En algunas realizaciones la cantidad de biomasa suficiente para incrementar la concentración del EPA tiene una densidad de alrededor de 10 g/l hasta alrededor de 250 g/l. El incremento en la concentración del EPA se puede comparar, por ejemplo, con la concentración de EPA en un microorganismo fermentado de forma similar en el que la biomasa no se incrementa.

En algunas realizaciones, la concentración de EPA de la biomasa desarrollada en un medio de cultivo que comprende un nivel superior de CO₂ (por ejemplo, en un recipiente que comprende CO₂ en una cantidad de más de o igual a 2%, más de o igual a 5%, más de o igual a 10%, más de o igual a 15%, más de o igual a 20%, de 5% a 20% o de 5% a 15% del gas total en el recipiente) es al menos 10%, al menos 50%, al menos 100%, al menos 250%, al menos 500%, al menos 750%, al menos 1000%, al menos 1100%, al menos 1200%, al menos 1300%, al menos 1400%, al menos 1500%, al menos 1600%, al menos 1700%, al menos 1800%, al menos 1900% o al menos 2000% mayor que la concentración de EPA en una biomasa obtenida a partir del microorganismo desarrollado en un medio de cultivo que comprende niveles inferiores de CO₂ (por ejemplo, en un recipiente que comprende CO₂ en una cantidad de menos de 2%, menos de 5%, menos de 10%, menos de 15%, menos de 20%, de 0% a 4% o de 1% a 3% del gas total en el recipiente, respectivamente). Por ejemplo, la concentración de EPA de la biomasa desarrollada en un medio de cultivo que comprende un nivel superior de CO₂ (por ejemplo, en un recipiente que comprende CO₂ en una cantidad de más de o igual a 2%, más de o igual a 5%, más de o igual a 10%, más de o igual a 15%, más de o igual a 20%, 5% a 20% o 5% a 15% del gas total en el recipiente) es al menos 10%, al menos 50%, al menos 100%, al menos 250%, al menos 500%, al menos 750%, al menos 1000%, al menos 1100%, al menos 1200%, al menos 1300%, al menos 1400%, al menos 1500%, al menos 1600%, al menos 1700%, al menos 1800%, al menos 1900% o al menos 2000% mayor que la concentración de EPA en una biomasa obtenida a partir del microorganismo desarrollado en un recipiente con un nivel de CO₂ ambiental.

Vitamina B12 en Medio de Cultivo

El término "vitamina B12", según se usa en la presente, se refiere a una clase de compuestos químicamente relacionados en formas tanto presentes en la naturaleza como sintéticas, incluyendo, pero no limitadas a, vitamina B12, cobalamina, cianocobalamina e hidroxocobalamina. En algunas realizaciones, la divulgación proporciona métodos para incrementar la concentración de EPA en la biomasa de un microorganismo que produce EPA al desarrollar el microorganismo en un medio de cultivo que tiene niveles bajos de vitamina B12 o en un medio de cultivo que no tiene vitamina B12. En algunas realizaciones, la divulgación proporciona métodos para elaborar una biomasa de un microorganismo que tiene una concentración incrementada de EPA, que comprende desarrollar el microorganismo en un medio de cultivo que comprende menos de 0,1 mg/l de vitamina B12 para producir una biomasa. En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende menos de 0,05 mg/l, menos de 0,01 mg/l, menos de 0,005 mg/l, menos de 0,001 mg/l, menos de 0,0005 mg/l, menos de 0,0001 mg/l o no contiene vitamina B12.

En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende menos de 1 g de fuentes de vitamina B12 (tales como extracto de levadura, sólidos de maceración de maíz, harina de soja, y otras fuentes de nitrógeno complejas) por 50 g de biomasa libre de lípidos. En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende menos de 0,8 g, menos de 0,5 g, menos de 0,3 g, menos de 0,1 g, menos de 0,05 g o menos de 0,01 g de estas fuentes de vitamina B12 por 50 g de biomasa libre de lípidos. En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende además menos de 1 g de extracto de levadura por 50 g de biomasa libre de lípidos, menos de 0,8 g de extracto de levadura por 50 g de biomasa libre

de lípidos, menos de 0,5 g de extracto de levadura por 50 g de biomasa libre de lípidos, menos de 0,3 g de extracto de levadura por 50 g de biomasa libre de lípidos, menos de 0,1 g de extracto de levadura por 50 g de biomasa libre de lípidos, menos de 0,05 g de extracto de levadura por 50 g de biomasa libre de lípidos o menos de 0,01 g de extracto de levadura por 50 g de biomasa libre de lípidos. Según se usa en la presente, el término "biomasa libre de lípidos" se refiere al peso de celular seco libre de grasa buscado del microorganismo después del cultivo.

En algunas realizaciones, la concentración de EPA de la biomasa desarrollada en un medio de cultivo que comprende un nivel inferior de vitamina B12 (por ejemplo, en un medio de cultivo que comprende menos de 0,1 mg/l, menos de 0,05 mg/l, menos de 0,01 mg/l, menos de 0,005 mg/l, menos de 0,001 mg/l, menos de 0,0005 mg/l, menos de 0,0001 mg/l o no comprende vitamina B12) es al menos 10%, al menos 25%, al menos 50%, al menos 75%, al menos 100%, al menos 150%, al menos 200%, al menos 250%, al menos 300%, al menos 350%, al menos 400%, al menos 450%, al menos 500%, al menos 550%, al menos 600%, al menos 650% o al menos 700% mayor que la concentración de EPA en una biomasa obtenida a partir del microorganismo desarrollado en un medio de cultivo que comprende niveles superiores de vitamina B12 (por ejemplo, en un medio de cultivo que comprende al menos 0,1 mg/l, al menos 0,05 mg/l, al menos 0,01 mg/l, al menos 0,005 mg/l, al menos 0,001 mg/l, al menos 0,0005 mg/l, al menos 0,0001 mg/l o al menos 0,00005 mg/l de vitamina B12, respectivamente). Por ejemplo, la concentración de EPA de la biomasa desarrollada en un medio de cultivo que no contiene vitamina B12 es al menos 10%, al menos 25%, al menos 50%, al menos 75%, al menos 100%, al menos 150%, al menos 200%, al menos 250%, al menos 300%, al menos 350%, al menos 400%, al menos 450%, al menos 500%, al menos 550%, al menos 600%, al menos 650% o al menos 700% mayor que la concentración de EPA en una biomasa obtenida a partir del microorganismo desarrollado en un medio de cultivo que comprende vitamina B12 (tal como al menos 0,0001 mg/l de vitamina B12).

En algunas realizaciones, la concentración de EPA de la biomasa desarrollada en un medio de cultivo que comprende niveles inferiores de vitamina B12 (por ejemplo, en un medio de cultivo que comprende menos de 0,1 mg/l, menos de 0,05 mg/l, menos de 0,01 mg/l, menos de 0,005 mg/l, menos de 0,001 mg/l, menos de 0,0005 mg/l, menos de 0,0001 mg/l o no comprende vitamina B12) bajo un nivel ambiental de CO₂ es al menos 100%, al menos 200%, al menos 300%, al menos 400% o al menos 500% mayor que la concentración de EPA en una biomasa obtenida a partir del microorganismo desarrollado en un medio de cultivo que comprende niveles superiores de vitamina B12 (por ejemplo, en un medio de cultivo que comprende al menos 0,1 mg/l, al menos 0,05 mg/l, al menos 0,01 mg/l, al menos 0,005 mg/l, al menos 0,001 mg/l, al menos 0,0005 mg/l, al menos 0,0001 mg/l o al menos 0,00005 mg/l de vitamina B12, respectivamente) bajo un nivel ambiental de CO₂. En algunas realizaciones, la concentración de EPA de la biomasa desarrollada en un medio de cultivo que comprende niveles inferiores de vitamina B12 bajo un nivel ambiental de CO₂ es de 100% a 700%, de 150% a 650%, de 200% a 600%, de 250% a 550% o de 300% a 500% mayor que la concentración de EPA en una biomasa obtenida a partir del microorganismo desarrollado en un medio de cultivo que comprende niveles superiores de vitamina B12 bajo un nivel ambiental de CO₂. En algunas realizaciones, la concentración de EPA de la biomasa desarrollada en un medio de cultivo que comprende niveles inferiores de vitamina B12 bajo un alto nivel de CO₂ (por ejemplo, un nivel de CO₂ disuelto de al menos 5%, al menos 10%, al menos 15% o al menos 20%) es al menos 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% o al menos 100% mayor que la concentración de EPA en una biomasa obtenida a partir del microorganismo desarrollado en un medio de cultivo que comprende niveles superiores de vitamina B12 bajo un alto nivel de CO₂. En algunas realizaciones, la concentración de EPA de la biomasa desarrollada en un medio de cultivo que comprende niveles inferiores de vitamina B12 bajo un alto nivel de CO₂ (por ejemplo, un nivel de CO₂ disuelto de al menos 5%, al menos 10%, al menos 15% o al menos 20%) es de 5% a 200%, de 10% a 175%, de 15% a 150%, de 20% a 125% o de 25% a 100% mayor que la concentración de EPA en una biomasa obtenida a partir del microorganismo desarrollado en un medio de cultivo que comprende niveles superiores de vitamina B12 bajo un alto nivel de CO₂. Por ejemplo, la concentración de EPA de la biomasa desarrollada en un medio de cultivo que no comprende vitamina B12 bajo un nivel ambiental de CO₂ es al menos 100%, al menos 200%, al menos 300%, al menos 400% o al menos 500% mayor que la concentración de EPA en una biomasa obtenida a partir del microorganismo desarrollado en un medio de cultivo que comprende vitamina B12 (tal como al menos 0,0001 mg/l de vitamina B12) bajo un nivel ambiental de CO₂. Como otro ejemplo, la concentración de EPA de la biomasa desarrollada en un medio de cultivo que no comprende vitamina B12 bajo un nivel de CO₂ disuelto de al menos 10% es al menos 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% o al menos 100% mayor que la concentración de EPA en una biomasa obtenida a partir del microorganismo desarrollado en un medio de cultivo que comprende vitamina B12 (tal como al menos 0,0001 mg/l de vitamina B12) bajo un nivel de CO₂ disuelto de al menos 10%.

En algunas realizaciones, la concentración de EPA se incrementa en al menos 100%, al menos 200%, al menos 300%, al menos 400% o al menos 500% en la biomasa de un microorganismo desarrollado en un medio de cultivo que tiene menos de 0,1 mg/l de vitamina B12 en comparación con el mismo microorganismo desarrollado en un medio de cultivo que tiene más de 0,1 mg/l de vitamina B12. En algunas realizaciones, la concentración de EPA se incrementa en al menos 100%, al menos 200%, al menos 300%, al menos 400% o al menos 500% en la biomasa de un microorganismo desarrollado en un medio de cultivo que tiene menos de 0,01 mg/l de vitamina B12 en comparación con el mismo microorganismo desarrollado en un medio de cultivo que tiene más de 0,01 mg/l de vitamina B12. En algunas realizaciones, la concentración de EPA se incrementa en al menos 100%, al menos 200%, al menos 300%, al menos 400% o al menos 500% en la biomasa de un microorganismo desarrollado en un medio de cultivo que tiene menos de

0,001 mg/l de vitamina B12 en comparación con el mismo microorganismo desarrollado en un medio de cultivo que tiene más de 0,001 mg/l de vitamina B12. En realizaciones adicionales, la concentración de EPA se incrementa en al menos 100%, al menos 200%, al menos 300%, al menos 400% o al menos 500% en la biomasa de un microorganismo desarrollado en un medio de cultivo que tiene menos de 0,0001 mg/l de vitamina B12 en comparación con el mismo microorganismo desarrollado en un medio de cultivo que tiene más de 0,0001 mg/l de vitamina B12. En algunas realizaciones, la concentración de EPA se incrementa en al menos 100%, al menos 200%, al menos 300%, al menos 400% o al menos 500% en la biomasa de un microorganismo desarrollado en un medio de cultivo que no tiene vitamina B12 en comparación con el mismo microorganismo desarrollado en un medio de cultivo que contiene una cantidad de vitamina B12. La determinación del incremento en la concentración de EPA en la biomasa se puede realizar al desarrollar un microorganismo en un medio de cultivo que tiene cantidades superiores de vitamina B12, desarrollar el mismo microorganismo en un medio de cultivo que tiene cantidades inferiores de vitamina B12 y comparar la concentración de EPA en la biomasa resultante de cada cultivo. En esta determinación, el contenido de los medios de cultivo que tienen cantidades superiores o inferiores de vitamina B12 es el mismo excepto por su nivel de vitamina B12.

En algunas realizaciones, la concentración de EPA de la biomasa del microorganismo desarrollado en un medio de cultivo que comprende al menos 0,1 mg/l, al menos 0,05 mg/l, al menos 0,01 mg/l, al menos 0,005 mg/l, al menos 0,001 mg/l, al menos 0,0005 mg/l o al menos 0,0001 mg/l de vitamina B12 es al menos 1%, al menos 2%, al menos 3%, al menos 4% o al menos 5% EPA en peso de los ácidos grasos totales. En algunas realizaciones, la concentración de EPA de la biomasa del microorganismo desarrollado en un medio de cultivo que comprende al menos 0,1 mg/l, al menos 0,05 mg/l, al menos 0,01 mg/l, al menos 0,005 mg/l, al menos 0,001 mg/l, al menos 0,0005 mg/l o al menos 0,0001 mg/l de vitamina B12 es de 1% a 50%, de 1% a 40%, de 1% a 30%, de 1% a 20%, de 2% a 50%, de 2% a 40%, de 2% a 30% o de 2% a 20% de EPA en peso de los ácidos grasos totales.

Cobalto en el Medio de Cultivo

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona métodos para elaborar una biomasa de un microorganismo que tiene una concentración incrementada de EPA, que comprende desarrollar el microorganismo en un medio de cultivo que comprende menos de 0,1 mg/l de cobalto para producir una biomasa. En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende menos de 0,05 mg/l, menos de 0,01 mg/l, menos de 0,005 mg/l, menos de 0,001 mg/l, menos de 0,0005 mg/l, menos de 0,0001 mg/l o no comprende cobalto.

En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende además menos de 1 g de extracto de levadura por 50 g de biomasa libre de lípidos, menos de 0,8 g de extracto de levadura por 50 g de biomasa libre de lípidos, menos de 0,5 g de extracto de levadura por 50 g de biomasa libre de lípidos, menos de 0,3 g de extracto de levadura por 50 g de biomasa libre de lípidos, menos de 0,1 g de extracto de levadura por 50 g de biomasa libre de lípidos, menos de 0,05 g de extracto de levadura por 50 g de biomasa libre de lípidos o menos de 0,01 g de extracto de levadura por 50 g de biomasa libre de lípidos.

En algunas realizaciones, la concentración de EPA de la biomasa desarrollada en un medio de cultivo que comprende un nivel inferior de cobalto (por ejemplo, en un medio de cultivo que comprende menos de 0,1 mg/l, menos de 0,05 mg/l, menos de 0,01 mg/l, menos de 0,005 mg/l, menos de 0,001 mg/l, menos de 0,0005 mg/l, menos de 0,0001 mg/l o no comprende cobalto) es al menos 10%, al menos 25%, al menos 50%, al menos 75%, al menos 100%, al menos 150%, al menos 200%, al menos 250%, al menos 300%, al menos 350%, al menos 400%, al menos 450%, al menos 500%, al menos 550%, al menos 600%, al menos 650% o al menos 700% mayor que la concentración de EPA en una biomasa obtenida a partir del microorganismo desarrollado en un medio de cultivo que comprende niveles superiores de cobalto (por ejemplo, en un medio de cultivo que comprende al menos 0,1 mg/l, al menos 0,05 mg/l, al menos 0,01 mg/l, al menos 0,005 mg/l, al menos 0,001 mg/l o al menos 0,0005 mg/l de cobalto, respectivamente). Por ejemplo, la concentración de EPA de la biomasa desarrollada en un medio de cultivo que no contiene cobalto es al menos 10%, al menos 25%, al menos 50%, al menos 75%, al menos 100%, al menos 150%, al menos 200%, al menos 250%, al menos 300%, al menos 350%, al menos 400%, al menos 450%, al menos 500%, al menos 550%, al menos 600%, al menos 650% o al menos 700% mayor que la concentración de EPA en una biomasa obtenida a partir del microorganismo desarrollado en un medio de cultivo que comprende cobalto (tal como al menos 0,0001 mg/l de cobalto).

En algunas realizaciones, la concentración de EPA de la biomasa desarrollada en un medio de cultivo que comprende niveles inferiores de cobalto (por ejemplo, en un medio de cultivo que comprende menos de 0,1 mg/l, menos de 0,05 mg/l, menos de 0,01 mg/l, menos de 0,005 mg/l, menos de 0,001 mg/l, menos de 0,0005 mg/l, menos de 0,0001 mg/l o no comprende cobalto) bajo un nivel ambiental de CO₂ es al menos 100%, al menos 200%, al menos 300%, al menos 400% o al menos 500% mayor que la concentración de EPA en una biomasa obtenida a partir del microorganismo desarrollado en un medio de cultivo que comprende niveles superiores de cobalto (por ejemplo, en un medio de cultivo que comprende al menos 0,1 mg/l, al menos 0,05 mg/l, al menos 0,01 mg/l, al menos 0,005 mg/l, al menos 0,001 mg/l, al menos 0,0005 mg/l o al menos 0,0001 mg/l de cobalto, respectivamente) bajo un nivel ambiental de CO₂. En algunas realizaciones, la concentración de EPA de la biomasa desarrollada en un medio de cultivo que comprende niveles inferiores de cobalto bajo un nivel ambiental de CO₂ es

de 100% a 700%, de 150% a 650%, de 200% a 600%, de 250% a 550% o de 300% a 500% mayor que la concentración de EPA en una biomasa obtenida a partir del microorganismo desarrollado en un medio de cultivo que comprende niveles superiores de cobalto bajo un nivel ambiental de CO₂. En algunas realizaciones, la concentración de EPA de la biomasa desarrollada en un medio de cultivo que comprende niveles inferiores de cobalto bajo un alto nivel de CO₂ (por ejemplo, un nivel de CO₂ disuelto de al menos 5%, al menos 10%, al menos 15% o al menos 20%) es al menos 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% o al menos 100% mayor que la concentración de EPA en una biomasa obtenida a partir del microorganismo desarrollado en un medio de cultivo que comprende niveles superiores de cobalto bajo un alto nivel de CO₂. En algunas realizaciones, la concentración de EPA de la biomasa desarrollada en un medio de cultivo que comprende niveles inferiores de cobalto bajo un alto nivel de CO₂ (por ejemplo, un nivel de CO₂ disuelto de al menos 5%, al menos 10%, al menos 15% o al menos 20%) es de 5% a 200%, de 10% a 175%, de 15% a 150%, de 20% a 125% o de 25% a 100% mayor que la concentración de EPA en una biomasa obtenida a partir del microorganismo desarrollado en un medio de cultivo que comprende niveles superiores de cobalto bajo un alto nivel de CO₂. Por ejemplo, la concentración de EPA de la biomasa desarrollada en un medio de cultivo que no comprende cobalto bajo un nivel ambiental de CO₂ es al menos 100%, al menos 200%, al menos 300%, al menos 400% o al menos 500% mayor que la concentración de EPA en una biomasa obtenida a partir del microorganismo desarrollado en un medio de cultivo que comprende cobalto (tal como al menos 0,0001 mg/l de cobalto) bajo un nivel ambiental de CO₂. Como otro ejemplo, la concentración de EPA de la biomasa desarrollada en un medio de cultivo que no comprende cobalto bajo un nivel de CO₂ disuelto de al menos 10% es al menos 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% o al menos 100% mayor que la concentración de EPA en una biomasa obtenida a partir del microorganismo desarrollado en un medio de cultivo que comprende cobalto (tal como al menos 0,0001 mg/l de cobalto) bajo un nivel de CO₂ disuelto de al menos 10%.

En algunas realizaciones, la concentración de EPA se incrementa en al menos 100%, al menos 200%, al menos 300%, al menos 400% o al menos 500% en la biomasa de un microorganismo desarrollado en un medio de cultivo que tiene menos de 0,1 mg/l de cobalto en comparación con el mismo microorganismo desarrollado en un medio de cultivo que tiene más de 0,1 mg/l de cobalto. En algunas realizaciones, la concentración de EPA se incrementa en al menos 100%, al menos 200%, al menos 300%, al menos 400% o al menos 500% en la biomasa de un microorganismo desarrollado en un medio de cultivo que tiene menos de 0,01 mg/l de cobalto en comparación con el mismo microorganismo desarrollado en un medio de cultivo que tiene más de 0,01 mg/l de cobalto. En algunas realizaciones, la concentración de EPA se incrementa en al menos 100%, al menos 200%, al menos 300%, al menos 400% o al menos 500% en la biomasa de un microorganismo desarrollado en un medio de cultivo que tiene menos de 0,001 mg/l de cobalto en comparación con el mismo microorganismo desarrollado en un medio de cultivo que tiene más de 0,001 mg/l de cobalto. En realizaciones adicionales, la concentración de EPA se incrementa en al menos 100%, al menos 200%, al menos 300%, al menos 400% o al menos 500% en la biomasa de un microorganismo desarrollado en un medio de cultivo que tiene menos de 0,0001 mg/l de cobalto en comparación con el mismo microorganismo desarrollado en un medio de cultivo que tiene más de 0,0001 mg/l de cobalto. En algunas realizaciones, la concentración de EPA se incrementa en al menos 100%, al menos 200%, al menos 300%, al menos 400% o al menos 500% en la biomasa de un microorganismo desarrollado en un medio de cultivo que no tiene cobalto en comparación con el mismo microorganismo desarrollado en un medio de cultivo que contiene una cantidad de cobalto. La determinación del incremento en la concentración de EPA en la biomasa se puede realizar al desarrollar un microorganismo en un medio de cultivo que tiene cantidades superiores de cobalto, desarrollar el mismo microorganismo en un medio de cultivo que tiene cantidades inferiores de cobalto y comparar la concentración de EPA en la biomasa resultante de cada cultivo. En esta determinación, el contenido de los medios de cultivo que tienen cantidades inferiores o superiores de cobalto es el mismo excepto por su nivel de cobalto.

En algunas realizaciones, la concentración de EPA de la biomasa del microorganismo desarrollado en un medio de cultivo que comprende al menos 0,1 mg/l, al menos 0,05 mg/l, al menos 0,01 mg/l, al menos 0,005 mg/l, al menos 0,001 mg/l, al menos 0,0005 mg/l o al menos 0,0001 mg/l de cobalto es al menos 1%, al menos 2%, al menos 3%, al menos 4% o al menos 5% de EPA en peso de los ácidos grasos totales. En algunas realizaciones, la concentración de EPA de la biomasa del microorganismo desarrollado en un medio de cultivo que comprende al menos 0,1 mg/l, al menos 0,05 mg/l, al menos 0,01 mg/l, al menos 0,005 mg/l, al menos 0,001 mg/l, al menos 0,0005 mg/l o al menos 0,0001 mg/l de cobalto es 1% a 50%, 1% a 40%, 1% a 30%, 1% a 20%, 2% a 50%, 2% a 40%, 2% a 30% o 2% a 20% de EPA en peso de los ácidos grasos totales.

El medio de cultivo que contiene bajas cantidades de vitamina B12, extracto de levadura y/o cobalto podría comprender además un nivel de CO₂ disuelto de al menos 5%, al menos 10%, al menos 15% o al menos 20%. La presente invención se dirige a una biomasa aislada de los métodos analizados en la presente, así como a un aceite microbiano extraído de la biomasa de los métodos.

La presente divulgación se dirige a un cultivo aislado que comprende cualquiera de los microorganismos de la invención o sus mezclas.

La presente divulgación se dirige a un producto alimenticio, un cosmético o una composición farmacéutica para un animal no humano o un ser humano, que comprende cualquiera de los microorganismos o las biomásas de la divulgación o sus mezclas.

5 La presente divulgación se dirige a un aceite microbiano que comprende al menos alrededor de 20% en peso de ácido eicosapentaenoico y menos de alrededor de 5% en peso de cada uno de ácido araquidónico, ácido docosapentaenoico n-6, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido eicosenoico, ácido erúrico y ácido estearidónico. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende además al menos alrededor de 25% en peso de ácido docosaheptaenoico.

10 La presente divulgación se dirige a un aceite microbiano que comprende una fracción de triacilglicerol de al menos alrededor de 10% en peso, en donde al menos alrededor de 12% en peso de los ácidos grasos en la fracción de triacilglicerol es ácido eicosapentaenoico, en donde al menos alrededor de 25% en peso de los ácidos grasos en la fracción de triacilglicerol es ácido docosaheptaenoico y en donde menos de alrededor de 5% en peso de los ácidos grasos en la fracción de triacilglicerol es ácido araquidónico.

15 La presente divulgación se dirige a un producto alimenticio, un cosmético o una composición farmacéutica para un animal no humano o un ser humano, que comprende cualquiera de los aceites microbianos de la invención. En algunas realizaciones, el producto alimenticio es una leche maternizada. En algunas realizaciones, la leche maternizada es adecuada para neonatos prematuros. En algunas realizaciones, el producto alimenticio es una leche, una bebida, una bebida terapéutica, una bebida nutricional o una de sus combinaciones. En algunas realizaciones, el producto alimenticio es un aditivo para el alimento para animales no humanos o seres humanos. En algunas realizaciones, el producto alimenticio es un complemento nutricional. En algunas realizaciones, el producto alimenticio es un pienso para animales. En algunas realizaciones, el pienso para animales es un pienso de piscicultura. En algunas realizaciones, el pienso para animales es un pienso para animales domésticos, un pienso para animales de zoológico, un pienso para animales de trabajo, un pienso para ganado o una de sus combinaciones.

20 La presente divulgación se dirige a un método para producir un aceite microbiano que comprende ácidos grasos omega-3, comprendiendo el método: desarrollar cualquiera de los microorganismos aislados de la divulgación o sus mezclas en un cultivo para producir un aceite que comprende ácidos grasos omega-3. En algunas realizaciones, el método comprende además extraer el aceite.

25 La presente invención se dirige a un método para producir un aceite microbiano que comprende ácidos grasos omega-3, comprendiendo el método extraer un aceite que comprende ácidos grasos omega-3 de cualquiera de las biomásas de la invención. En algunas realizaciones, el aceite microbiano se extrae usando un procedimiento de extracción con disolventes orgánicos, por ejemplo extracción con hexano. En algunas realizaciones, el aceite microbiano se extrae usando un procedimiento de extracción sin disolvente.

30 La presente invención se dirige a un aceite microbiano producido mediante un método de la invención.

35 La presente invención se dirige a un método para producir una biomasa de la divulgación, que comprende: desarrollar cualquiera de los microorganismos aislados de la divulgación o sus mezclas en un cultivo para producir una biomasa.

40 La presente divulgación se dirige a una biomasa producida mediante un método de la invención.

45 La presente divulgación se dirige a un método para producir una cepa mutante de la divulgación, que comprende: mutagenizar cualquiera de los microorganismos de la invención y aislar la cepa mutante.

50 La presente divulgación se dirige al uso de cualquiera de los microorganismos aislados, las biomásas o los aceites microbianos de la divulgación o sus mezclas, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la inflamación o una afección relacionada con la misma.

55 La presente divulgación se dirige al uso de cualquiera de los microorganismos aislados, las biomásas o los aceites microbianos de la divulgación o sus mezclas, para el tratamiento de la inflamación o una afección relacionada con la misma.

60 La presente divulgación se dirige a cualquiera de los microorganismos aislados, las biomásas o los aceites microbianos de la divulgación o sus mezclas, para el uso en el tratamiento de la inflamación o una afección relacionada con la misma.

La presente divulgación se dirige a un método para tratar la inflamación o una afección relacionada con la misma en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto cualquiera de los microorganismos aislados, las biomásas o los aceites microbianos de la divulgación o sus mezclas, y un portador farmacéuticamente aceptable.

La presente invención se dirige a métodos para producir aceites microbianos, y biomasas, a partir de los microorganismos de la divulgación, y también se divulgan métodos para usar los microorganismos, las biomasas y los aceites microbianos.

Microorganismos

5 En algunas realizaciones, una célula microbiana para el uso con la presente invención es un microorganismo del tipo Labyrinthulomycota. En algunas realizaciones, una célula microbiana del tipo Labyrinthulomycota es un traustokitrido, tal como un *Schizochytrium* o *Thraustochytrium*. Según la presente invención, el término "traustokitrido" 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.

10 Se consideraba previamente que los miembros de la familia Labyrinthulaceae eran miembros del orden Thraustochytriales, pero en revisiones más recientes de la clasificación taxonómica de estos organismos, se considera ahora que la familia Labyrinthulaceae es un miembro del orden Labyrinthulales. Se considera que tanto Labyrinthulales como Thraustochytriales son miembros del tipo Labyrinthulomycota. Generalmente, los taxónomos sitúan ahora a ambos grupos de microorganismos con las algas o los protistas algáceos del linaje Stramenopile. La situación taxonómica actual de los traustokitridos y los labirintulidos se puede resumir como sigue:

Reino: Stramenopila (Chromista)

20 Tipo: Labyrinthulomycota (Heterokonta)

Clase: Labyrinthulomycetes (Labyrinthulae)

Orden: Labyrinthulales

Familia: Labyrinthulaceae

25 Orden: Thraustochytriales

Familia: Thraustochytriaceae

30 Para los propósitos de la presente invención, cepas de células microbianas descritas como traustokitridos incluyen los siguientes organismos: Orden: Thraustochytriales; Familia: Thraustochytriaceae; Género: *Thraustochytrium* (Especie: sp., *arudimentale*, *aureum*, *benthicola*, *globosum*, *kinnei*, *motivum*, *multirudimentale*, *pachydermum*, *proliferum*, *roseum*, y *striatum*), *Ulkenia* (Especie: sp., *amoeboides*, *keruelensis*, *minuta*, *profunda*, *radiata*, *sailens*, *sarkariana*, *schizochytrids*, *visurgensis*, *yorkensis* y sp. BP-5601), *Schizochytrium* (Especie: sp., *aggregatum*, *limnaceum*, *mangrovei*, *minutum*, y *octosporum*), *Japonochytrium* (Especie: sp., *marinum*), *Aplanochytrium* (Especie: sp., *halitidis*, *keruelensis*, *profunda*, y *stocchinoi*), *Althornia* (Especie: sp., *crouchi*) o *Elina* (Especie: sp., *marisalba*, y *sinorifica*). Para los propósitos de esta invención, se considerará que las especies descritas dentro de *Ulkenia* son miembros del género *Thraustochytrium*. *Aurantiacochytrium* y *Oblogospora* son dos géneros adicionales abarcados por el tipo Labyrinthulomycota en la presente invención. En algunas realizaciones, una célula microbiana es de los géneros *Thraustochytrium*, *Schizochytrium* y sus mezclas.

40 La divulgación se dirige a microorganismos aislados y cepas derivadas de los mismos. Una cepa que se "derive" de un microorganismo aislado de la divulgación puede ser un derivado natural o artificial tal como, por ejemplo, una cepa mutante, variante o recombinante. El término "aislado", según se usa en la presente, no refleja necesariamente la extensión hasta la que un aislado se ha purificado, sino que indica el aislamiento o la separación de una forma natural o un ambiente natural. Un aislado puede incluir, pero no se limita a, un microorganismo aislado, una biomasa aislada, un cultivo aislado, un aceite microbiano aislado y una secuencia aislada (tal como una secuencia polinucleotídica aislada divulgada en la presente). El término "microorganismo", según se usa en la presente, incluye, pero no se limita a, los términos "microalgas", "traustokitrido" y las clasificaciones taxonómicas asociadas con cualquiera de los microorganismos descritos en la presente. Los términos "Thraustochytriales", "traustokitrido", "*Schizochytrium*" y "*Thraustochytrium*", según se usan en referencia a cualquiera de los microorganismos de la divulgación, incluyendo los microorganismos depositados descritos en la presente, se basan en las presentes clasificaciones taxonómicas incluyendo la información filogenética disponible y no pretenden ser limitativos en caso de que las clasificaciones taxonómicas se revisen después de la fecha de presentación de la presente solicitud.

55 En algunas realizaciones, la divulgación se dirige a un microorganismo aislado de la especie depositada bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-10212. El microorganismo aislado asociado con el N° de Registro de la ATCC PTA-10212 también se conoce en la presente como *Thraustochytrium* sp. ATCC PTA-10212. El microorganismo aislado asociado con el N° de Registro de la ATCC PTA-10212 fue depositado bajo el Tratado de Budapest el 14 de julio de 2009 en

the American Type Culture Collection, Patent Depository, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209. En algunas realizaciones, la divulgación se dirige a una cepa aislada depositada bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-10212. En algunas realizaciones la divulgación se dirige a un microorganismo aislado depositado bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-10212, PTA-10213, PTA-10214, PTA-10215, PTA-10208, PTA-10209, PTA-10210 o PTA-10211.

En algunas realizaciones, la divulgación se dirige a un microorganismo aislado que tiene las características de la especie depositada bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-10212 o una cepa derivada del mismo. Las características de la especie depositada bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-10212 pueden incluir su desarrollo y propiedades fenotípicas (ejemplos de propiedades fenotípicas incluyen propiedades morfológicas y reproductivas), sus propiedades físicas y químicas (tales como pesos secos y perfiles lipídicos), sus secuencias génicas, y combinaciones de las mismas, en las que las características distinguen la especie sobre una especie previamente identificada. En algunas realizaciones, la divulgación se dirige a un microorganismo aislado que tiene las características de la especie depositada bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-10212, en donde las características incluyen un ARNr 18s que comprende la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO:1 o una secuencia polinucleotídica que tiene al menos 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO:1, las propiedades morfológicas y reproductivas de la especie depositada bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-10212 y los perfiles de ácidos grasos de la especie depositada bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-10212. En algunas realizaciones, los microorganismos aislados de la divulgación tienen propiedades fenotípicas sustancialmente idénticas a las del microorganismo depositado bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-10212. En algunas realizaciones, los microorganismos aislados de la divulgación tienen propiedades de desarrollo sustancialmente idénticas a las del microorganismo depositado bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-10212. En algunas realizaciones, la divulgación se dirige a un microorganismo aislado que comprende un ARNr 18s que comprende la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO:1 o una secuencia polinucleotídica que tiene al menos 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, la divulgación se dirige a un microorganismo aislado que comprende una secuencia polinucleotídica de ARNr 18s que tiene al menos 94% de identidad con la secuencia polinucleotídica de ARNr 18s del microorganismo depositado bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-10212.

En algunas realizaciones, la divulgación se dirige a una cepa mutante del microorganismo depositado bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-10212. En realizaciones adicionales, la cepa mutante es una cepa depositada bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-10213, PTA-10214 o PTA-10215. Los microorganismos asociados con los N° de Registro de la ATCC PTA-10213, PTA-10214 y PTA-10215 fueron depositados bajo el Tratado de Budapest el 14 de julio de 2009 en the American Type Culture Collection, Patent Depository, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209.

En algunas realizaciones, la divulgación se dirige a un microorganismo aislado de la especie depositada bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-10208. El microorganismo aislado asociado con el N° de Registro de la ATCC PTA-10208 también se conoce en la presente como *Schizochytrium* sp. ATCC PTA-10208. El microorganismo asociado con el N° de Registro de la ATCC PTA-10208 fue depositado bajo el Tratado de Budapest el 14 de julio de 2009 en the American Type Culture Collection, Patent Depository, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209. En algunas realizaciones, la divulgación se dirige a una cepa aislada depositada bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-10208.

En algunas realizaciones, la divulgación se dirige a un microorganismo aislado de la especie depositada bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-10208, en donde los ácidos grasos totales producidos por el microorganismo comprenden más de alrededor de 10%, más de alrededor de 11%, más de alrededor de 12%, más de alrededor de 13%, más de alrededor de 14%, más de alrededor de 15%, más de alrededor de 16%, más de alrededor de 17%, más de alrededor de 18%, más de alrededor de 19% o más de alrededor de 20% en peso de EPA. En algunas realizaciones, la divulgación se dirige a un microorganismo aislado de la especie depositada bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-10208, en donde los ácidos grasos totales producidos por el microorganismo comprenden de alrededor de 10% a alrededor de 55%, de alrededor de 10% a alrededor de 50%, de alrededor de 10% a alrededor de 45%, de alrededor de 10% a alrededor de 40%, de alrededor de 10% a alrededor de 35%, de alrededor de 10% a alrededor de 30%, de alrededor de 15% a alrededor de 55%, de alrededor de 15% a alrededor de 50%, de alrededor de 15% a alrededor de 45%, de alrededor de 15% a alrededor de 40%, de alrededor de 15% a alrededor de 35%, de alrededor de 15% a alrededor de 30%, de alrededor de 20% a alrededor de 55%, de alrededor de 20% a alrededor de 50%, de alrededor de 20% a alrededor de 45%, de alrededor de 20% a alrededor de 40%, de alrededor de 20% a alrededor de 35% o alrededor de 20% a alrededor de 30% en peso de EPA.

En algunas realizaciones, la divulgación se dirige a un microorganismo aislado que tiene las características de la especie depositada bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-10208, en donde los ácidos grasos totales producidos por el microorganismo comprenden más de alrededor de 10% en peso de ácido eicosapentaenoico. Las características del microorganismo depositado bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-10208 incluyen su desarrollo y propiedades fenotípicas (ejemplos de propiedades fenotípicas incluyen propiedades morfológicas y reproductivas), sus propiedades físicas y químicas (tales como pesos secos y perfiles lipídicos), sus secuencias génicas, y combinaciones de los mismos, en los que las características distinguen la especie de una especie previamente identificada. En algunas realizaciones, la divulgación se dirige a un microorganismo aislado que tiene las características de la especie depositada bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-10212, en donde las características incluyen un ARNr 18s que comprende la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO:2, las propiedades morfológicas y reproductivas de la especie

depositada bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-10208 y los perfiles de ácidos grasos de la especie depositada bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-10208. En algunas realizaciones, los microorganismos aislados de la divulgación tienen propiedades físicas y químicas sustancialmente idénticas a las del microorganismo depositado bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-10208.

En algunas realizaciones, la divulgación se dirige a una cepa mutante del microorganismo depositado bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-10208. En realizaciones adicionales, la cepa mutante es una cepa depositada bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-10209, PTA-10210 o PTA-10211. Los microorganismos asociados con los N° de Registro de la ATCC PTA-10209, PTA-10210 y PTA-10211 fueron depositados bajo el Tratado de Budapest el 25 de septiembre de 2009 en the American Type Culture Collection, Patent Depository, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209.

En algunas realizaciones, la divulgación se dirige a un microorganismo aislado de la invención que produce una fracción de triacilglicerol, en donde el contenido de EPA de la fracción de triacilglicerol es al menos alrededor de 12%, al menos alrededor de 13%, al menos alrededor de 14%, al menos alrededor de 15%, al menos alrededor de 16%, al menos alrededor de 17%, al menos alrededor de 18%, al menos alrededor de 19% o al menos alrededor de 20% en peso. En algunas realizaciones, la divulgación se dirige a un microorganismo aislado que produce una fracción de triacilglicerol, en donde el contenido de EPA de la fracción de triacilglicerol es de alrededor de 12% a alrededor de 55%, de alrededor de 12% a alrededor de 50%, de alrededor de 12% a alrededor de 45%, de alrededor de 12% a alrededor de 40%, de alrededor de 12% a alrededor de 35%, de alrededor de 12% a alrededor de 30%, de alrededor de 15% a alrededor de 45%, de alrededor de 15% a alrededor de 40%, de alrededor de 15% a alrededor de 35%, de alrededor de 15% a alrededor de 30% o de alrededor de 20% a alrededor de 30% en peso.

En algunas realizaciones, la divulgación se dirige a un mutante, una variante o un recombinante de un microorganismo aislado de la divulgación que produce una fracción de triacilglicerol, en donde el contenido de EPA de la fracción de triacilglicerol es al menos alrededor de 10%, al menos alrededor de 11%, al menos alrededor de 12%, al menos alrededor de 13%, al menos alrededor de 14%, al menos alrededor de 15%, al menos alrededor de 16%, al menos alrededor de 17%, al menos alrededor de 18%, al menos alrededor de 19% o al menos alrededor de 20% en peso. En algunas realizaciones, la divulgación se dirige a un mutante, una variante o un recombinante de un microorganismo aislado de la divulgación que produce una fracción de triacilglicerol, en donde el contenido de EPA de la fracción de triacilglicerol es de alrededor de 12% a alrededor de 55%, de alrededor de 12% a alrededor de 50%, de alrededor de 12% a alrededor de 45%, de alrededor de 12% a alrededor de 40%, de alrededor de 12% a alrededor de 35%, de alrededor de 12% a alrededor de 30%, de alrededor de 15% a alrededor de 55%, de alrededor de 15% a alrededor de 50%, de alrededor de 15% a alrededor de 45%, de alrededor de 15% a alrededor de 40%, de alrededor de 15% a alrededor de 35%, de alrededor de 15% a alrededor de 30%, de alrededor de 20% a alrededor de 55%, de alrededor de 20% a alrededor de 50%, de alrededor de 20% a alrededor de 45%, de alrededor de 20% a alrededor de 40%, de alrededor de 20% a alrededor de 35% o de alrededor de 20% a alrededor de 30% en peso. Las cepas mutantes se pueden producir mediante procedimientos muy conocidos. Procedimientos comunes incluyen irradiación, tratamiento a altas temperaturas y tratamiento con un mutágeno. Las cepas variantes pueden ser otros aislados y/o subaislados presentes en la naturaleza de la especie descrita en la presente. Las cepas recombinantes se pueden producir mediante cualesquiera métodos bien conocidos en biología molecular para la expresión de genes exógenos o la alteración de la función o la expresión de genes endógenos. En algunas realizaciones, la cepa mutante, variante o recombinante produce una cantidad superior de ácidos grasos omega-3, particularmente EPA, que la cepa silvestre. En algunas realizaciones, la cepa mutante, variante o recombinante produce una cantidad inferior de uno o más ácidos grasos, tal como cantidades inferiores de DHA, ARA, DPA n-6 o sus combinaciones. En algunas realizaciones, la cepa mutante, variante o recombinante produce un peso celular seco mayor por litro de cultivo que la cepa silvestre. Estas cepas mutantes, variantes o recombinantes son ejemplos de cepas derivadas de un microorganismo aislado de la divulgación.

La presente divulgación también se dirige a un microorganismo traustóquitrado aislado que tiene las características de la especie de traustóquitrado depositada bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-9695, en donde los ácidos grasos totales producidos por dicho microorganismo o cepa derivada del mismo comprenden alrededor de 10% en peso o menos de ácido eicosapentaenoico.

La presente divulgación también se dirige a un microorganismo traustóquitrado aislado o una cepa derivada del mismo, que comprende una fracción de triglicéridos, en donde el contenido de ácido docosahexaenoico de la fracción de triglicéridos es al menos alrededor de 40% en peso, en donde el contenido de ácido docosapentaenoico n-6 de la fracción de triglicéridos es de al menos alrededor de 0,5% en peso a alrededor de 6% en peso y en donde los ácidos grasos totales producidos por dicho microorganismo o cepa derivada del mismo comprenden alrededor de 10% en peso o menos de ácido eicosapentaenoico.

La presente divulgación también se dirige a un microorganismo traustóquitrado aislado de la misma especie que el traustóquitrado depositado bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-9695 o una cepa derivada del mismo, en donde los ácidos grasos totales producidos por dicho microorganismo o cepa derivada del mismo comprenden alrededor de 10% en peso o menos de ácido eicosapentaenoico.

En algunas realizaciones, la cepa derivada del microorganismo traustokitrido aislado de la divulgación es un cepa mutante.

5 La presente divulgación también se dirige a un microorganismo aislado depositado bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-9695, PTA-9696, PTA-9697 o PTA-9698.

La presente divulgación también se dirige a una biomasa de traustokitrido que comprende uno cualquiera de los microorganismos traustokitridos de la divulgación o sus mezclas.

10 La presente divulgación también se dirige a una biomasa de traustokitrido aislada, en donde al menos alrededor de 50% en peso del peso celular seco de la biomasa son ácidos grasos, y en donde al menos alrededor de 50% en peso de los ácidos grasos son ácidos grasos omega-3. En algunas realizaciones, al menos alrededor de 50% en peso de los ácidos grasos es ácido docosahexaenoico. La presente divulgación también se dirige a una biomasa de traustokitrido aislada, en donde al menos alrededor de 25% en peso del peso celular seco de la biomasa es ácido docosahexaenoico.

En algunas realizaciones, la presente divulgación también se dirige a una biomasa de traustokitrido aislada en donde alrededor de 10% en peso o menos de los ácidos grasos es ácido eicosapentaenoico, y en donde la relación en peso ratio de ácido docosahexaenoico a ácido eicosapentaenoico es al menos alrededor de 5:1.

20 En algunas realizaciones, la presente divulgación también se dirige a una biomasa de traustokitrido aislada en la que alrededor de 1,5% en peso o menos de los ácidos grasos es ácido araquidónico, y en donde la relación en peso de ácido docosahexaenoico a ácido araquidónico es al menos alrededor de 20:1.

25 En algunas realizaciones, la presente divulgación también se dirige a una biomasa de traustokitrido aislada que comprende ácido docosahexaenoico y ácido docosapentaenoico n-6 en una relación en peso de al menos alrededor de 10:1. En algunas realizaciones, la divulgación se dirige a un traustokitrido de la especie depositada bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-9695. El traustokitrido aislado también se conoce en la presente como *Schizochytrium sp.* ATCC PTA-9695. El traustokitrido asociado con el N° de Registro de la ATCC PTA-9695 fue depositado bajo el Tratado de Budapest el 7 de enero de 2009 en the American Type Culture Collection, Patent Depository, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209.

35 En algunas realizaciones, la divulgación se dirige a una cepa de traustokitrido aislada depositada bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-9695. En algunas realizaciones, la divulgación se dirige a un microorganismo traustokitrido aislado de la misma especie que el traustokitrido depositado bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-9695.

40 En algunas realizaciones, la divulgación se dirige a un traustokitrido aislado que tiene las características de la especie depositada bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-9695 o una cepa derivada del mismo. Las características de la especie de traustokitrido depositada bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-9695 incluyen su desarrollo y propiedades fenotípicas (ejemplos de propiedades fenotípicas incluyen propiedades morfológicas y reproductivas), sus propiedades físicas y químicas (tales como pesos secos y perfiles lipídicos) y sus secuencias génicas. En algunas realizaciones, los traustokitridos aislados de la divulgación tienen propiedades fenotípicas sustancialmente idénticas del traustokitrido depositado bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-9695. En algunas realizaciones, los traustokitridos aislados de la divulgación tienen propiedades de desarrollo sustancialmente idénticas a las del traustokitrido depositado bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-9695.

50 En algunas realizaciones, la divulgación se dirige a un mutante, una variante o un recombinante de un traustokitrido aislado de la divulgación, en donde los ácidos grasos totales producidos por el mutante, la variante o el recombinante comprenden alrededor de 10% en peso o menos de ácido eicosapentaenoico. Las cepas mutantes se pueden producir mediante procedimientos muy conocidos. Procedimientos comunes incluyen irradiación; tratamiento a altas temperaturas; y tratamiento con un mutágeno. Las cepas variantes pueden ser otros aislados y/o subaislados presentes en la naturaleza de la especie descrita en la presente. Las cepas recombinantes se pueden producir mediante métodos bien conocidos en la biología molecular para la expresión de genes exógenos o la alteración de la función o la expresión de genes endógenos. En algunas realizaciones, la cepa mutante, variante o recombinante produce una cantidad superior de ácidos grasos omega-3, incluyendo DHA y/o EPA, que la cepa silvestre. En algunas realizaciones, la cepa mutante, variante o recombinante produce una cantidad inferior de uno o más ácidos grasos, tales como cantidades inferiores de EPA, ARA, DPA n-6 o sus combinaciones. En algunas realizaciones, la cepa mutante, variante o recombinante produce un peso celular seco por litro de cultivo mayor que la cepa silvestre. Estas cepas mutantes, variantes o recombinantes son ejemplos de cepas derivadas de un traustokitrido aislado de la divulgación.

65 En algunas realizaciones, la divulgación se dirige a una cepa mutante del traustokitrido depositado bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-9695. En realizaciones adicionales, la cepa mutante es una cepa depositada bajo los N° de Registro de la ATCC PTA-9696, PTA-9697 o PTA-9698. Las cepas de traustokitrido asociadas con los N° de Registro de la ATCC PTA-9696, PTA-9697 y PTA-9698 fueron depositadas bajo el Tratado de Budapest el 7 de enero de 2009 en the American Type Culture Collection, Patent Depository, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209.

Estas cepas mutantes depositadas son derivados del traustoitrido depositado bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-9695.

- 5 En algunas realizaciones, un traustoitrido aislado de la divulgación, incluyendo sus mutantes, variantes o recombinantes, comprende un perfil de ácidos grasos en una o más fracciones aisladas del traustoitrido. La una o más fracciones aisladas del traustoitrido incluyen la fracción de ácidos grasos totales, la fracción de ésteres esteróicos, la fracción de triglicéidos, la fracción de ácidos grasos libre, la fracción de esteroides, la fracción de diglicéidos, la fracción polar (incluyendo la fracción de fosfolípidos), y sus combinaciones.
- 10 La presente divulgación también se dirige a un cultivo de traustoitrido aislado que comprende uno cualquiera de los microorganismos traustoitridos de la divulgación o sus mezclas. En algunas realizaciones, el cultivo comprende al menos alrededor de 5% de oxígeno disuelto.
- 15 La presente divulgación también se dirige a un producto alimenticio, un cosmético o una composición farmacéutica para animales o seres humanos que comprende uno cualquiera de los microorganismos traustoitridos o las biomazas de la divulgación o sus mezclas.
- 20 La presente divulgación también se dirige a un aceite microbiano que comprende una fracción de triglicéidos de al menos alrededor de 70% en peso, en donde el contenido de ácido docosahexaenoico de la fracción de triglicéidos es al menos alrededor de 50% en peso, y en donde el contenido de ácido docosapentaenoico n-6 de la fracción de triglicéidos es de alrededor de 0,5% en peso a alrededor de 6% en peso. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende además un contenido de ácido araquidónico de la fracción de triglicéidos de alrededor de 1,5% en peso o menos.
- 25 La presente divulgación también se dirige a un aceite microbiano que comprende una fracción de triglicéidos de al menos alrededor de 70% en peso, en donde el contenido de ácido docosahexaenoico de la fracción de triglicéidos es al menos alrededor de 40% en peso, en donde el contenido de ácido docosapentaenoico n-6 de la fracción de triglicéidos es de al menos alrededor de 0,5% en peso a alrededor de 6% en peso, y en donde la relación de ácido docosahexaenoico a ácido docosapentaenoico n-6 es mayor de alrededor de 6:1.
- 30 La presente divulgación también se dirige a un aceite microbiano que comprende una fracción de triglicéidos de al menos alrededor de 70% en peso, en donde el contenido de ácido docosahexaenoico de la fracción de triglicéidos es al menos alrededor de 60% en peso.
- 35 En algunas realizaciones, al menos alrededor de 20% de los triglicéidos en la fracción de triglicéidos del aceite microbiano contiene ácido docosahexaenoico en dos posiciones en el triglicéido seleccionadas de dos cualesquiera de las posiciones *sn*-1, *sn*-2 y *sn*-3. En algunas realizaciones, al menos alrededor de 5% de los triglicéidos en la fracción de triglicéidos del aceite microbiano contiene ácido docosahexaenoico en las tres de las posiciones *sn*-1, *sn*-2 y *sn*-3 en el triglicéido.
- 40 En algunas realizaciones, un microorganismo aislado de la divulgación, incluyendo sus mutantes, variantes y recombinantes, comprende un perfil de ácidos grasos en una o más fracciones aisladas del microorganismo. La una o más fracciones aisladas del microorganismo incluyen la fracción de ácidos grasos totales, la fracción de ésteres esteróicos, la fracción de triacilgliceroides, la fracción de ácidos grasos libres, la fracción de esteroides, la fracción de diacilglicerol, la fracción polar (incluyendo la fracción de fosfolípidos), y sus combinaciones. El perfil de ácidos grasos para una fracción específica puede incluir cualquiera de los perfiles de ácidos grasos asociados con la fracción específica que se divulga en la presente.
- 45 La divulgación se dirige a un método para producir un mutante que comprende mutagenizar cualquiera de los microorganismos de la divulgación y aislar la cepa mutante.
- 50

Cultivos y Biomazas Aisladas

- 55 La divulgación se dirige a un cultivo que comprende uno o más microorganismos aislados de la divulgación. Se conocen en la especialidad diversos parámetros de fermentación para inocular, desarrollar y recuperar microflora, tales como microalgas y traustoitridos. Véase, p. ej., la Patente de EE. UU. N° 5.130.242. Los medios líquidos o sólidos pueden contener agua marina natural o artificial. Fuentes de carbono para desarrollo heterotrófico incluyen, pero no se limitan a, glucosa, fructosa, xilosa, sacarosa, maltosa, almidón soluble, melaza, fucosa, glucosamina, dextrano, grasas, aceites, glicerol, acetato sódico y manitol. Fuentes de nitrógeno incluyen, pero no se limitan a, peptona, extracto de levadura, polipeptona, extracto de malta, extracto de carne, un casaminoácido, licor de maceración de maíz, fuentes de nitrógeno orgánico, glutamato sódico, urea, fuentes de nitrógeno inorgánico, acetato amónico, sulfato amónico, cloruro amónico y nitrato amónico.
- 60

Un medio típico para el desarrollo del microorganismo depositado bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-10212 se muestra en la Tabla 1:

Tabla 1: 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>Después del tratamiento en 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
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
<u>Después del tratamiento en Autoclave (Vitaminas)</u>		
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
Pantotenato 1/2-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
<u>Después del tratamiento en Autoclave (Carbono)</u>		
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	alrededor de 6,5 - alrededor de 9,5, alrededor de 6,5 - alrededor de 8,0 o alrededor de 6,8 - alrededor de 7,8;
temperatura:	alrededor de 15 - alrededor de 30 grados Celsius, alrededor de 18 - alrededor de 28 grados Celsius o de alrededor de 21 a alrededor de 23 grados Celsius;
oxígeno disuelto:	alrededor de 0,1 - alrededor de 100% de saturación , alrededor de 5 - alrededor de 50% de saturación o alrededor de 10 - alrededor de 30% de saturación; y/o
glicerol controlado a:	alrededor de 5 - alrededor de 50 g/l, alrededor de 10 - alrededor de 40 g/l o alrededor de 15 - alrededor de 35 g/l.

5 En algunas realizaciones, el microorganismo depositado bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-10212 o un mutante, una variante o un recombinante del mismo se desarrolla heterotróficamente sobre glicerol como la fuente de carbono pero no se desarrolla sobre glucosa como la fuente de carbono.

10 Un medio típico para el desarrollo del microorganismo depositado bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-10208 se muestra en la Tabla 2:

Tabla 2: 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>Después del tratamiento en 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>Después del tratamiento en autoclave (Vitaminas)</u>			
Tiamina	mg/l	9,75	0,1-100, 1-50 o 5-25
Pantotenato 1/2-Ca	mg/l	3,33	0,1-100, 0,1-50 o 1-10
Biotina	mg/l	3,58	0,1-100, 0,1-50 o 1-10
<u>Después del tratamiento en autoclave (Carbono)</u>			
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 de cultivo típicas incluirían lo siguiente:

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

5 En algunas realizaciones, el volumen de fermentación (volumen de cultivo) es al menos alrededor de 2 litros, al menos alrededor de 10 litros, al menos alrededor de 50 litros, al menos alrededor de 100 litros, al menos alrededor de 200 litros, al menos alrededor de 500 litros, al menos alrededor de 1000 litros, al menos alrededor de 10.000 litros, al menos alrededor de 20.000 litros, al menos alrededor de 50.000 litros, al menos alrededor de 100.000 litros, al menos alrededor de 150.000 litros, al menos alrededor de 200.000 litros o al menos alrededor de 250.000 litros. En algunas realizaciones, el volumen de fermentación es de alrededor de 2 litros a alrededor de 300.000 litros, alrededor de 2 litros, alrededor de 10 litros, alrededor de 50 litros, alrededor de 100 litros, alrededor de 200 litros, alrededor de 500 litros, alrededor de 1000 litros, alrededor de 10.000 litros, alrededor de 20.000 litros, alrededor de 50.000 litros, alrededor de 100.000 litros, alrededor de 150.000 litros, alrededor de 200.000 litros, alrededor de 250.000 litros o alrededor de 300.000 litros.

En algunas realizaciones, la invención se dirige a una biomasa aislada que comprende un perfil de ácidos grasos de la invención. En algunas realizaciones, al menos alrededor de 20%, al menos alrededor de 25%, al menos alrededor de 30%, al menos alrededor de 35%, al menos alrededor de 40%, al menos alrededor de 45%, al menos alrededor de 50%, al menos alrededor de 55%, al menos alrededor de 60%, al menos alrededor de 65%, al menos alrededor de 70%, al menos alrededor de 75% o al menos alrededor de 80% del peso celular seco de la biomasa son ácidos grasos.

En algunas realizaciones, más de alrededor de 20%, más de alrededor de 25%, más de alrededor de 30%, más de alrededor de 35%, más de alrededor de 40%, más de alrededor de 45%, más de alrededor de 50%, más de alrededor de 55% o más de alrededor de 60% del peso celular seco de la biomasa son ácidos grasos. En algunas realizaciones, de alrededor de 20% a alrededor de 55%, de alrededor de 20% a alrededor de 60%, de alrededor de 20% a alrededor de 70%, de alrededor de 20% a alrededor de 80%, de alrededor de 30% a alrededor de 55%, de alrededor de 30% a alrededor de 70%, de alrededor de 30% a alrededor de 80%, de alrededor de 40% a alrededor de 60%, de alrededor de 40% a alrededor de 70%, de alrededor de 40% a alrededor de 80%, de alrededor de 50% a alrededor de 60%, de alrededor de 50% a alrededor de 70%, de alrededor de 50% a alrededor de 80%, de alrededor de 55% a alrededor de 70%, de alrededor de 55% a alrededor de 80%, de alrededor de 60% a alrededor de 70% o alrededor de 60% a alrededor de 80% en peso del peso celular seco de la biomasa son ácidos grasos. En algunas realizaciones, la biomasa comprende más de alrededor de 10%, al menos alrededor de 12%, al menos alrededor de 15%, al menos alrededor de 20%, al menos alrededor de 25%, al menos alrededor de 30%, de al menos alrededor de 35%, al menos alrededor de 40% o al menos alrededor de 45% en peso de los ácidos grasos como EPA. En algunas realizaciones, la biomasa comprende de alrededor de 10% a alrededor de 55%, de alrededor de 12% a alrededor de 55%, de alrededor de 15% a alrededor de 55%, de alrededor de 20% a alrededor de 55%, de alrededor de 20% a alrededor de 40% o alrededor de 20% a alrededor de 30% en peso de los ácidos grasos como EPA. En algunas realizaciones, la biomasa comprende una fracción de triacilglicerol, en la que al menos alrededor de 12%, al menos alrededor de 13%, al menos alrededor de 14%, al menos alrededor de 15%, al menos alrededor de 16%, al menos alrededor de 17%, al menos alrededor de 18%, al menos alrededor de 19% o al menos alrededor de 20% en peso de la fracción de triacilglicerol es EPA. En algunas realizaciones, la biomasa comprende una fracción de triacilglicerol, en donde el contenido de EPA de la fracción de triacilglicerol es de al menos de alrededor de 12% a alrededor de 55%, de alrededor de 12% a alrededor de 50%, de alrededor de 12% a alrededor de 45%, de al menos de alrededor de 12% a alrededor de 40%, de al menos de alrededor de 12% a alrededor de 35% o de al menos de alrededor de 12% a alrededor de 30%, de alrededor de 15% a alrededor de 55%, de alrededor de 15% a alrededor de 50%, de alrededor de 15% a alrededor de 45%, de alrededor de 15% a alrededor de 40%, de alrededor de 15% a alrededor de 35%, de alrededor de 15% a alrededor de 30%, de alrededor de 20% a alrededor de 55%, de alrededor de 20% a alrededor de 50%, de alrededor de 20% a alrededor de 45%, al menos alrededor de 20% a alrededor de 40%, de al menos alrededor de 20% a alrededor de 35% o de alrededor de 20% a alrededor de 30% en peso. En algunas realizaciones, al menos alrededor de 20%, al menos alrededor de 25%, al menos alrededor de 30%, al menos alrededor de 35%, al menos alrededor de 40%, al menos alrededor de 50% o al menos alrededor de 60% en peso del peso celular seco de la biomasa es DHA. En algunas realizaciones, de alrededor de 20% a alrededor de 60%, de alrededor de 25% a alrededor de 60%, de alrededor de 25% a alrededor de 50%, de alrededor de 25% a alrededor de 45%, de alrededor de 30% a alrededor de 50% o de alrededor de 35% a alrededor de 50% en peso del peso celular seco de la biomasa es DHA. En algunas realizaciones, la biomasa comprende alrededor de 10% o menos, alrededor de 9% o menos, alrededor de 8% o menos, alrededor de 7% o menos, alrededor de 6% o menos, alrededor de 5% o menos, alrededor de 4% o menos, alrededor de 3% o menos, alrededor de 2% o menos o alrededor de 1% en peso o menos de los ácidos grasos como DHA. En algunas realizaciones, la biomasa comprende de alrededor de 1% a alrededor de 10%, de alrededor de 1% a alrededor de 5%, de alrededor de 2% a alrededor de 5%, de alrededor de 3% a alrededor de 5% o de alrededor de 3% a alrededor de 10% en peso de los ácidos grasos como DHA. En algunas realizaciones, la biomasa está sustancialmente libre de DHA. En algunas realizaciones, la biomasa comprende de alrededor de 0,1% a menos de alrededor de 5%, de alrededor de 0,1% a alrededor de 4%, de alrededor de 0,1% a alrededor de 3%, de alrededor de 0,1% a alrededor de 2%, de alrededor de 0,2% a menos de alrededor de 5%, de alrededor de 0,2% a alrededor de 4%, de alrededor de 0,2% a alrededor de 3%, de alrededor de 0,2% a alrededor de 2%, de alrededor de 0,3% a alrededor de 2%, de alrededor de 0,1% a alrededor de 0,5%, de alrededor de 0,2% a alrededor de 0,5%, de alrededor de 0,1% a alrededor de 0,4%, de alrededor de 0,2% a alrededor de 0,4%, de alrededor de 0,5% a alrededor de 2%, de alrededor de 1% a alrededor de 2%, de alrededor de 0,5% a alrededor de 1,5% o de alrededor de 1% a alrededor de 1,5% en peso de los ácidos grasos como ARA. En algunas realizaciones, la biomasa comprende menos de alrededor de 5%, alrededor de 4% o menos, alrededor de 3% o menos, alrededor de 2% o menos, alrededor de 1,5% o menos, alrededor de 1% o menos, alrededor de 0,5% o menos, alrededor de 0,4% o menos, alrededor de 0,3% o menos, alrededor de 0,2% o menos o alrededor de 0,1% en peso o menos de los ácidos grasos como ARA. En algunas realizaciones, la biomasa está sustancialmente libre de ARA. En algunas realizaciones, la biomasa comprende de alrededor de 0,4% a alrededor de 2%, de alrededor de 0,4% a alrededor de 3%, de alrededor de 0,4% a alrededor de 4%, de alrededor de 0,4% a alrededor de 5%, de alrededor de 0,4% a menos de alrededor de 5%, de alrededor de 0,5% a alrededor de 1%, de alrededor de 0,5% a alrededor de 2%, de alrededor de 0,5% a alrededor de 3%, de alrededor de 0,5% a alrededor de 4%, de alrededor de 0,5% a alrededor de 5%, de alrededor de 0,5% a menos de alrededor de 5%, de alrededor de 1% a alrededor de 2%, de alrededor de 1% a alrededor de 3%, de alrededor de 1% a alrededor de 4%, alrededor de 1% a alrededor de 5% o de alrededor de 1% a menos de alrededor de 5% en peso de los ácidos grasos como DPA n-6. En algunas realizaciones, la biomasa comprende alrededor de 5% o menos, menos de alrededor de 5%, alrededor de 4% o menos, alrededor de 3% o menos, alrededor de 2% o menos, alrededor de 1% o menos, alrededor de 0,75% o menos, alrededor de 0,6% o menos o alrededor de 0,5% en peso o menos de los ácidos grasos como DPA n-6. En algunas realizaciones, la biomasa está sustancialmente libre de DPA n-6. En

algunas realizaciones, la biomasa comprende ácidos grasos con alrededor de 5% o menos, menos de alrededor de 5%, alrededor de 4% o menos, alrededor de 3% o menos o alrededor de 2% en peso o menos de ácido oleico (18:1 n-9), ácido linoleico (18:2 n-6), ácido linolénico (18:3 n-3), ácido eicosenoico (20:1 n-9), ácido erúcico (22:1 n-9) o sus combinaciones.

5 Las características de una biomasa aislada de la divulgación están asociadas con propiedades endógenas o naturales de la biomasa aislada en lugar de materiales introducidos exógenamente. En algunas realizaciones, la biomasa aislada no contiene polivinilpirrolidona o no se aísla de un cultivo que contiene polivinilpirrolidona.

10 La presente invención se dirige a un método para producir una biomasa. En algunas realizaciones, el método para producir una biomasa de la divulgación comprende desarrollar cualquiera de los microorganismos aislados de la divulgación o sus mezclas en un cultivo para producir una biomasa. La presente divulgación se dirige a una biomasa producida mediante el método.

15 En algunas realizaciones, la biomasa comprende ácidos grasos, en donde los ácidos grasos comprenden además ácidos grasos poliinsaturados omega-3, en donde los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 comprenden DHA y EPA en una cantidad de alrededor de $\geq 90\%$, en peso, de la cantidad total de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y la cantidad de EPA, en peso, es de alrededor de 6% hasta alrededor de 65% de la cantidad total de EPA y DHA. Se proporciona particularmente una biomasa en la que la cantidad de EPA, en peso, es de alrededor de 6% hasta
20 alrededor de 28% de la cantidad total de EPA y DHA. Se proporciona además en la presente una biomasa en la que la cantidad de EPA, en peso, es de alrededor de 36% hasta alrededor de 65 de la cantidad total del EPA y el DHA. Más particularmente, se proporciona una biomasa en la que la cantidad de EPA, en peso, es de alrededor de 28% a alrededor de 36% de la cantidad total de EPA y DHA.

25 Algunas realizaciones proporcionadas en la presente comprenden una biomasa que comprende ácidos grasos, en donde los ácidos grasos comprenden además DHA y EPA y la cantidad de EPA, en peso, es de alrededor de 15 hasta alrededor de 60% del peso total de EPA y DHA.

30 Algunas realizaciones de la divulgación se dirigen además a un cultivo que comprende un traustokitrido o una cepa mutante, depositado bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-9695. Se conocen en la especialidad diversos parámetros de fermentación para inocular, desarrollar y recuperar microflora, tales como los descritos en la Patente de EE. UU. N° 5.130.242. Se puede usar cualquier medio convencional para el desarrollo de traustokitridos. Los medios líquidos o sólidos pueden contener agua marina natural o artificial. Fuentes de carbono incluyen, pero no se limitan a, glucosa, fructosa, xilosa, sacarosa, maltosa, almidón soluble, melazas, fucosa, glucosamina, dextrano, grasas, aceites, glicerol,
35 acetato sódico y manitol. Fuentes de nitrógeno incluyen, pero no se limitan a, peptona, extracto de levadura, polipeptona, extracto de malta, extracto de carne, un casaminoácido, licor de maceración de maíz, fuentes de nitrógeno orgánico, glutamato sódico, urea, fuentes de nitrógeno inorgánico, acetato amónico, sulfato amónico, cloruro amónico, nitrato amónico, sulfato sódico. Un medio típico se muestra en la Tabla 3:

40 Tabla 3: Medios para el Recipiente de PTA-9695

<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>Después del tratamiento en 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>Ingrediente</u>	<u>concentración</u>	<u>intervalos</u>
<u>Después del tratamiento en 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
Pantotenato ½-Ca**	mg/l	3,33 0,1-100, 0,1-50 o 1-10
<u>Después del tratamiento en autoclave (Carbono)</u>		
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 21,6 0-150, 10-100 o 15-50

** Esterilizado por filtración

Condiciones de cultivo típica incluirían las siguientes:

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

- 5 En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende al menos alrededor de 5%, al menos alrededor de 10%, al menos alrededor de 20%, al menos alrededor de 30%, al menos alrededor de 40%, al menos alrededor de 50%, al menos alrededor de 60%, al menos alrededor de 70%, al menos alrededor de 80% o al menos alrededor de 90% de oxígeno disuelto, como un porcentaje del nivel de saturación. En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende de alrededor de 5% a alrededor de 20%, de alrededor de 5% a alrededor de 50%, de alrededor de 5% a alrededor de 100%, de alrededor de 10% a alrededor de 20%, de alrededor de 10% a alrededor de 50%, de alrededor de 10% a alrededor de 100%, de alrededor de 20% a alrededor de 50% o de alrededor de 20% a alrededor de 100% de oxígeno disuelto, como un porcentaje del nivel de saturación.

- 15 La invención se dirige además a una biomasa aislada de un traustokitrido de la divulgación. Una biomasa de traustokitrido aislada de la invención es una biomasa celular recogida mediante cualquier método convencional para el aislamiento de una biomasa de traustokitrido, tal como se describe en la Patente de EE. UU. N° 5.130.242 y la Publicación de Solicitud de EE. UU. N° 2002/0001833.

- 20 En algunas realizaciones, el peso celular seco de la biomasa aislada de cada litro de cultivo es al menos alrededor de 50 g, al menos alrededor de 60 g, al menos alrededor de 70 g, al menos alrededor de 80 g, al menos alrededor de 100 g, al menos alrededor de 120 g, al menos alrededor de 140 g, al menos alrededor de 160 g, al menos alrededor de 180 g o al menos alrededor de 200 g después del desarrollo durante alrededor de 7 días a de alrededor de 17°C a alrededor de 30°C en un medio de cultivo de alrededor de pH 6,5 a alrededor de 8,5 que comprende fuentes de carbono, nitrógeno y nutrientes, y de alrededor de 950 ppm a alrededor de 8500 ppm de iones cloruro. En algunas realizaciones, el peso celular seco de la biomasa aislada de cada litro de cultivo es al menos alrededor de 50 g, al menos alrededor de 60 g, al menos alrededor de 70 g, al menos alrededor de 80 g, al menos alrededor de 100 g, al menos alrededor de 120 g, al menos alrededor de 140 g, al menos alrededor de 160 g, al menos alrededor de 180 g o al menos alrededor de 200 g después del desarrollo durante alrededor de 7 días a alrededor de 17°C, a alrededor de 18°C, a alrededor de 19°C, a alrededor de 20°C, a alrededor de 21°C, a alrededor de 22°C, a alrededor de 23°C, a alrededor de 24°C, a alrededor de 25°C, a alrededor de 26°C, a alrededor de 27°C, a alrededor de 28°C, a alrededor de 29°C o a alrededor de 30°C en un medio de cultivo de alrededor de pH 6,5, alrededor de pH 7, alrededor de pH 7,5, alrededor de pH 8,0 o alrededor de pH 8,5 que comprende fuentes de carbono, nitrógeno y nutrientes, y de alrededor de 950 ppm a alrededor de 8500 ppm de iones cloruro. En algunas realizaciones, el peso celular seco de la biomasa aislada de cada litro de cultivo es de alrededor de 50 g a alrededor de 200 g después del desarrollo durante alrededor de 7 días a de alrededor de 17°C a alrededor de 30°C en un medio de cultivo de alrededor de pH 6,5 a alrededor de pH 8,5 que comprende fuentes de carbono, nitrógeno y nutrientes, y de alrededor de 950 ppm a alrededor de 8500 ppm de iones cloruro. En algunas realizaciones, el peso celular seco de la biomasa aislada de cada litro de cultivo es de alrededor de 50 g a alrededor de 200 g después del desarrollo durante alrededor de 7 días a alrededor de 17°C, a alrededor de 18°C, a alrededor de 19°C, a alrededor de 20°C, a alrededor de 21°C, a alrededor de 22°C, a alrededor de 23°C, a alrededor de 24°C, a alrededor de 25°C, a alrededor de 26°C, a alrededor de 27°C, a alrededor

de 28°C, a alrededor de 29°C o a alrededor de 30°C en un medio de cultivo de alrededor de pH 6,5, alrededor de pH 7, alrededor de pH 7,5, alrededor de pH 8,0 o alrededor de pH 8,5 que comprende fuentes de carbono, nitrógeno y nutrientes, y de alrededor de 950 ppm a alrededor de 8500 ppm de iones cloruro.

5 En algunas realizaciones, el cultivo de traustequitruido aislado tiene una productividad de ácidos grasos omega-3 de al menos alrededor de 2 g/l/día, al menos alrededor de 4 g/l/día o al menos alrededor de 8 g/l/día después del desarrollo durante alrededor de 7 días a de alrededor de 17°C a alrededor de 30°C en un medio de cultivo de alrededor de pH 6,5 a alrededor de pH 8,5 que comprende fuentes de carbono, nitrógeno y nutrientes, y alrededor de 950 ppm a
10 alrededor de 8500 ppm de iones cloruro. En algunas realizaciones, el cultivo de traustequitruido aislado tiene una productividad de ácidos grasos omega-3 de entre alrededor de 1 g/l/día a alrededor de 20 g/l/día, de alrededor de 2 g/l/día a alrededor de 15 g/l/día, de alrededor de 2 g/l/día a alrededor de 10 g/l/día, de alrededor de 3 g/l/día a alrededor de 10 g/l/día o de alrededor de 4 g/l/día a alrededor de 9 g/l/día, después del desarrollo durante alrededor de 7 días a de alrededor de 17°C a alrededor de 30°C en un medio de cultivo de alrededor de pH de 6,5 a alrededor de pH 8,5
15 que comprende fuentes de carbono, nitrógeno y nutrientes, y de alrededor de 950 ppm a alrededor de 8500 ppm de iones cloruro.

En algunas realizaciones, el volumen de fermentación (volumen de cultivo) es al menos alrededor de 2 litros, al menos alrededor de 10 litros, al menos alrededor de 50 litros, al menos alrededor de 100 litros, al menos alrededor de 200
20 litros, al menos alrededor de 500 litros, al menos alrededor de 1000 litros, al menos alrededor de 10.000 litros, al menos alrededor de 20.000 litros, al menos alrededor de 50.000 litros, al menos alrededor de 100.000 litros, al menos alrededor de 150.000 litros, al menos alrededor de 200.000 litros o al menos alrededor de 250.000 litros. En algunas realizaciones, el volumen de fermentación es de alrededor de 2 litros a alrededor de 300.000 litros, alrededor de 2 litros, alrededor de 10 litros, alrededor de 50 litros, alrededor de 100 litros, alrededor de 200 litros, alrededor de 500
25 litros, alrededor de 1000 litros, alrededor de 10.000 litros, alrededor de 20.000 litros, alrededor de 50.000 litros, alrededor de 100.000 litros, alrededor de 150.000 litros, alrededor de 200.000 litros, alrededor de 250.000 litros o alrededor de 300.000 litros.

En algunas realizaciones, la invención se dirige a una biomasa de traustequitruido aislada que comprende un perfil de ácidos grasos de la invención. En algunas realizaciones, al menos alrededor de 50%, al menos alrededor de 60%, al
30 menos alrededor de 70% o al menos alrededor de 80% del peso celular seco de la biomasa son ácidos grasos. En algunas realizaciones, más de alrededor de 50%, más de alrededor de 55% o más de alrededor de 60% del peso celular seco de la biomasa son ácidos grasos. En algunas realizaciones, de alrededor de 50% a alrededor de 60%, de alrededor de 50% a alrededor de 70%, de alrededor de 50% a alrededor de 80%, de alrededor de 55% a alrededor de 70%, de alrededor de 55% a alrededor de 80%, de alrededor de 60% a alrededor de 70% o de alrededor de 60% a
35 alrededor de 80% en peso del peso celular seco de la biomasa son ácidos grasos. En algunas realizaciones, la biomasa comprende al menos alrededor de 50%, al menos alrededor de 60%, al menos alrededor de 70% o al menos alrededor de 80% en peso de los ácidos grasos como ácidos grasos omega-3. En algunas realizaciones, la biomasa comprende de alrededor de 50% a alrededor de 60%, de alrededor de 50% a alrededor de 70%, de alrededor de 50% a alrededor de 80% en peso de los ácidos grasos como ácidos grasos omega-3. En algunas realizaciones, la biomasa
40 comprende al menos alrededor de 50%, al menos alrededor de 55%, al menos alrededor de 60%, al menos alrededor de 65%, al menos alrededor de 70%, al menos alrededor de 75% o al menos alrededor de 80% en peso de los ácidos grasos como DHA. En algunas realizaciones, la biomasa comprende de alrededor de 50% a alrededor de 60%, de alrededor de 50% a alrededor de 70% o de alrededor de 50% a alrededor de 80% en peso de los ácidos grasos como DHA. En algunas realizaciones, al menos alrededor de 25%, al menos alrededor de 30%, al menos alrededor de 40%,
45 al menos alrededor de 50% o al menos alrededor de 60% en peso del peso celular seco de la biomasa es ácido docosahexaenoico. En algunas realizaciones, de alrededor de 25% a alrededor de 65%, de alrededor de 25% a alrededor de 50%, de alrededor de 30% a alrededor de 40% o de alrededor de 25% a alrededor de 35% en peso del peso celular seco de la biomasa es ácido docosahexaenoico. En algunas realizaciones, la biomasa comprende alrededor de 10% o menos, alrededor de 9% o menos, alrededor de 8% o menos, alrededor de 7% o menos, alrededor de
50 de 6% o menos, alrededor de 5% o menos, alrededor de 4% o menos, en peso de los ácidos grasos como EPA. En algunas realizaciones, la biomasa comprende de alrededor de 2% a alrededor de 5%, de alrededor de 3% a alrededor de 5% o de alrededor de 3% a alrededor de 10% en peso de los ácidos grasos como EPA. En algunas realizaciones, la biomasa comprende una relación en peso de DHA a EPA de al menos alrededor de 5:1, al menos alrededor de 7:1, al menos alrededor de 10:1, al menos alrededor de 11:1, al menos alrededor de 14:1, al menos alrededor de 15:1, al
55 menos alrededor de 17:1, al menos alrededor de 20:1, al menos alrededor de 25:1, al menos alrededor de 50:1 o al menos alrededor de 100:1, en donde la biomasa comprende alrededor de 10% en peso o menos de los ácidos grasos como EPA. En algunas realizaciones, la biomasa comprende de alrededor de 0,1% a 0,2%, de alrededor de 0,1% a alrededor de 0,3%, de alrededor de 0,1% a alrededor de 0,4%, de alrededor de 0,1% a alrededor de 0,5% o de alrededor de 0,1% a alrededor de 1,5% en peso de los ácidos grasos como ARA. En algunas realizaciones, la biomasa
60 comprende alrededor de 1,5% o menos, alrededor de 1% o menos, alrededor de 0,5% o menos, alrededor de 0,4% o menos, alrededor de 0,3% o menos, alrededor de 0,2% o menos o alrededor de 0,1% en peso o menos de los ácidos grasos como ARA. En algunas realizaciones, la biomasa está sustancialmente libre de ARA. En algunas realizaciones, la biomasa comprende una relación en peso de DHA a ARA de al menos alrededor de 20:1, al menos alrededor de 40:1, al menos alrededor de 60:1, al menos alrededor de 80:1, al menos alrededor de 100:1, al menos alrededor de 150:1, al menos alrededor de 200:1, al menos alrededor de 250:1 o al menos alrededor de 300:1. En algunas
65 realizaciones, la biomasa comprende de alrededor de 0,5% a alrededor de 1%, de alrededor de 0,5% a alrededor de

2%, de alrededor de 0,5% a alrededor de 5%, de alrededor de 0,5% a alrededor de 6%, de alrededor de 1% a alrededor de 5%, de alrededor de 1% a alrededor de 6%, de alrededor de 2% a alrededor de 5% o de alrededor de 2% a alrededor de 6% en peso de los ácidos grasos como DPA n-6. En algunas realizaciones, la biomasa comprende alrededor de 6% o menos, alrededor de 5% o menos, alrededor de 2% o menos, alrededor de 1% o menos o alrededor de 0,5% en peso o menos de los ácidos grasos como DPA n-6. En algunas realizaciones, la biomasa está sustancialmente libre de DPA n-6. En algunas realizaciones, la biomasa comprende una relación en peso de DHA a DPA n-6 de más de alrededor de 6:1, al menos alrededor de 8:1, al menos alrededor de 10:1, al menos alrededor de 15:1, al menos alrededor de 20:1, al menos alrededor de 25:1, al menos alrededor de 50:1 o al menos alrededor de 100:1. En algunas realizaciones, la biomasa comprende ácidos grasos con alrededor de 5% o menos, alrededor de 4% o menos, alrededor de 3% o menos o alrededor de 2% en peso o menos de cada uno de ácido linoleico (18:2 n-6), ácido linolénico (18:3 n-3), ácido eicosenoico (20:1 n-9) y ácido erúcido (22:1 n-9).

En otra realización proporcionada en la presente, está una biomasa que comprende ácidos grasos, en donde los ácidos grasos comprenden además ácidos grasos poliinsaturados omega-3, en donde los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 comprenden DHA y EPA en una cantidad de alrededor de más de o igual a alrededor de 58-68%, particularmente alrededor de 60%, en peso, de la cantidad total de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y la cantidad de EPA, en peso, es de alrededor de 5% hasta alrededor de 60% de la cantidad total del peso total del EPA y el DHA.

Las características de una biomasa aislada de la divulgación están asociadas con propiedades endógenas o naturales de la biomasa aislada en lugar de material introducido exógenamente.

Aceites microbianos

Se proporcionan en la presente aceites, en particular aceites microbianos, elaborados mediante los métodos descritos anteriormente.

En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende ácidos grasos, en donde los ácidos grasos comprenden además ácidos grasos poliinsaturados omega-3, en donde los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 comprenden DHA y EPA en una cantidad de alrededor de $\geq 90\%$, en peso, de la cantidad total de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y la cantidad de EPA, en peso, es de alrededor de 6% hasta alrededor de 65% de la cantidad total de EPA y DHA. Particularmente, se proporciona un aceite microbiano en el que la cantidad de EPA, en peso, es de alrededor de 6% hasta alrededor de 28% de la cantidad total de EPA y DHA. Se proporciona además un aceite microbiano en el que la cantidad de EPA, en peso, es de alrededor de 36% hasta alrededor de 65 de la cantidad total del EPA y el DHA. Más particularmente, se proporciona un aceite microbiano en el que la cantidad de EPA, en peso, es de alrededor de 28% a alrededor de 36% de la cantidad total de EPA y DHA.

En una realización adicional proporcionada en la presente, está comprendido un aceite microbiano que comprende ácidos grasos, en donde los ácidos grasos comprenden además DHA y EPA y la cantidad de EPA, en peso, es de alrededor de 15 hasta alrededor de 60% del peso total de EPA y DHA.

En otra realización proporcionada en la presente, está un aceite microbiano que comprende ácidos grasos, en donde los ácidos grasos comprenden además ácidos grasos poliinsaturados omega-3, en donde los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 comprenden DHA y EPA en una cantidad de alrededor de más de o igual a alrededor de 58-68%, particularmente alrededor de 60%, en peso, de la cantidad total de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y la cantidad de EPA, en peso, es de alrededor de 5% hasta alrededor de 60% de la cantidad total del peso total de el EPA y el DHA.

La invención se dirige a un aceite microbiano que comprende un perfil de ácidos grasos de la invención. Un aceite microbiano de la invención es un "aceite crudo" o un "aceite refinado" que comprende una fracción de triacilglicerol de al menos alrededor de 35% en peso. Un "aceite crudo" es un aceite que se extrae de la biomasa del microorganismo sin procesamiento adicional. Un "aceite refinado" es un aceite que se obtiene al tratar un aceite crudo con un procesamiento estándar de refinado, blanqueo y/o desodorización. Véase, p. ej., la Patente de EE. UU. N° 5.130.242. Un aceite microbiano también incluye un "aceite final" según se describe en la presente, que es un aceite refinado que se ha diluido con un aceite vegetal. En algunas realizaciones, un aceite final es un aceite refinado que se ha diluido con aceite de girasol con alto contenido de ácido oleico. El término "microbiano", según se usa en la presente, incluye, pero no se limita a, los términos "microalgáico", "traustochytrido" y clasificaciones taxonómicas asociadas con cualquiera de los microorganismos depositados descritos en la presente. Los términos "Thraustochytriales", "traustochytrido", "*Schizochytrium*" y "*Thraustochytrium*", según se usan en referencia a cualquiera de los aceites microbianos de los microorganismos depositados descritos en la presente, se basan en clasificaciones taxonómicas presentes incluyendo la información filogenética disponible y no pretenden limitarse en caso de que las clasificaciones taxonómicas se revisen después de la fecha de presentación de la presente solicitud.

En algunas realizaciones, un ácido graso según se describe en la presente puede ser un éster de ácido graso. En algunas realizaciones, un éster de ácido graso incluye un éster de un ácido graso omega-3, un ácido graso omega-6,

y sus combinaciones. En algunas realizaciones, el éster de ácido graso es un éster de DHA, un éster de EPA o una de sus combinaciones. En algunas realizaciones, un aceite o una de sus fracciones según se describen en la presente se esterifica para producir un aceite o una de sus fracciones que comprende ésteres de ácido graso. El término "éster" se refiere al cambio del hidrógeno del grupo ácido carboxílico por otro sustituyente. Ésteres típicos son conocidos por los expertos en la especialidad, un análisis de los cuales es proporcionado por Higuchi, T. y V. Stella en *Pro-drugs as Novel Delivery Systems*, Vol. 14, A.C.S. Symposium Series, Bioreversible Carriers in Drug Design, Ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association, Pergamon Press, 1987, y *Protective Groups in Organic Chemistry*, McOmie ed., Plenum Press, Nueva York, 1973. Ejemplos de ésteres incluyen metílico, etílico, propílico, butílico, pentílico, t-butílico, bencílico, nitrobencílico, metoxibencílico, benzhidrílico y tricloroetílico. En algunas realizaciones, el éster es un grupo éster protector de ácido carboxílico, ésteres con aralquilo (p. ej., bencilo, fenetilo), ésteres con alquenilo inferior (p. ej., alilo, 2-butenilo), ésteres con alcoxi(inferior)-alquilo(inferior) (p. ej., metoximetilo, 2-metoxietilo, 2-etoxietilo), ésteres con alcanilo(inferior)-alquilo(inferior) (p. ej., acetoximetilo, pivaloiloximetilo, 1-pivaloiloxietilo), ésteres con alcoxi(inferior)-carbonil-alquilo(inferior) (p. ej., metoxycarbonilmetilo, isopropoxycarbonilmetilo), ésteres con carboxi-alquilo(inferior) (p. ej., carboximetilo), ésteres con alcoxi(inferior)-carbonilo(inferior)-alquilo(inferior) (p. ej., 1-(etoxycarbonilo)etilo, 1-(ciclohexiloxycarbonilo)etilo), ésteres con carbamoilo(inferior)-alquilo(inferior) (p. ej., carbamoiloximetilo), y similares. En algunas realizaciones, el sustituyente añadido es un grupo hidrocarbonado lineal o cíclico, p. ej., un éster alquílico C1-C6, cicloalquílico C1-C6, alquenílico C1-C6 o arílico C1-C6. En algunas realizaciones, el éster es un éster alquílico, p. ej., un éster metílico, un éster etílico o un éster propílico. En algunas realizaciones, el sustituyente éster se añade a la molécula de ácido graso libre cuando el ácido graso está en estado purificado o semipurificado. Alternativamente, el éster de ácido graso se forma al convertir un triacilglicerol en un éster.

La presente invención se dirige a métodos para producir aceites microbianos. En algunas realizaciones, el método comprende desarrollar cualquiera de los microorganismos aislados de la divulgación o sus mezclas en un cultivo para producir un aceite microbiano que comprende ácidos grasos omega-3. En algunas realizaciones, el método comprende además extraer el aceite microbiano. En algunas realizaciones, el método comprende extraer un aceite microbiano que comprende ácidos grasos omega-3 de cualquiera de las biomasa de la invención o sus mezclas. En algunas realizaciones, el método comprende desarrollar heterotróficamente el microorganismo aislado, en donde el cultivo comprende una fuente de carbono según se describe en la presente. El aceite microbiano se puede extraer de una biomasa recientemente recogida o se puede extraer de una biomasa previamente recogida que se ha almacenado bajo condiciones que eviten el deterioro. Se pueden usar métodos conocidos para cultivar un microorganismo de la divulgación, para aislar una biomasa del cultivo, para extraer un aceite microbiano de la biomasa y para analizar el perfil de ácidos grasos de aceites extraídos de la biomasa. Véase, p. ej., la Patente de EE. UU. N° 5.130.242. La invención se dirige a un aceite microbiano producido mediante cualquiera de los métodos de la invención.

En algunas realizaciones, el aceite microbiano se extrae mediante un método de extracción enzimático. En algunas realizaciones, el aceite microbiano se extrae mediante un método de extracción mecánico. En algunas realizaciones, el método de extracción mecánico comprende uno o más de: (1) procesar un caldo de fermentación pasteurizado a través de un homogeneizador para ayudar en la lisis celular y liberar aceite de las células; (2) añadir alcohol isopropílico al caldo de fermentación después de la homogenización para romper la emulsión de aceite y agua; (3) centrifugar la mezcla para recuperar la fase oleosa; y (4) secar bajo vacío con adición de antioxidantes. En algunas realizaciones, el aceite crudo se purifica. En algunas realizaciones, la purificación del aceite crudo comprende uno o más de: (1) bombear el aceite crudo a un depósito de refinado y calentar el aceite, seguido por la adición de una solución con mezcladura; (2) añadir una solución cáustica al aceite después del tratamiento con ácido; (3) recalentar el aceite crudo y a continuación centrifugar para separar la fase pesada del aceite refinado; (4) retirar los compuestos polares remanentes, metales vestigiales y productos de oxidación procedentes del aceite refinado al usar, por ejemplo, ácido, TriSil®, arcilla y/o filtración; (5) filtrar con refrigeración el aceite blanqueado para retirar adicionalmente componentes de alto punto de fusión del aceite para conseguir el nivel de claridad deseado; (6) calentar el aceite, después de lo cual el aceite se refrigera y se mantiene durante un período haciendo que los triglicéridos de alto punto de fusión y las ceras cristalicen; (7) añadir un adyuvante de filtración al aceite refrigerado y a continuación retirar los sólidos cristalizados mediante filtración; (8) usar un desodorizador después de la filtración en frío, manejado bajo alta temperatura y vacío, para retirar, por ejemplo, peróxidos y cualesquiera compuestos de bajo peso molecular remanentes que puedan provocar malos olores y sabores; (9) transferir el aceite al depósito de alimentación del desodorizador, desairear y desodorizar, por ejemplo, en un desodorizador de columna de relleno; y (10) enfriar, por ejemplo, bajo una atmósfera de nitrógeno al final del ciclo de desodorización y añadir antioxidantes adecuados al aceite desodorizado para proporcionar estabilidad oxidativa.

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

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

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

En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de esteroides de alrededor de 0,3% a alrededor de 5%, de alrededor de 0,3% a alrededor de 2%, de alrededor de 0,3% a alrededor de 1,5%, de alrededor de 0,5% a alrededor de 1,5%, de alrededor de 1% a alrededor de 1,5%, de alrededor de 0,5% a alrededor de 2%, de alrededor de 0,5% a alrededor de 5%, de alrededor de 1% a alrededor de 2% o de alrededor de 1% a alrededor de 5% en peso. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de esteroides de alrededor de 5% o menos, alrededor de 4% o menos, alrededor de 3% o menos, alrededor de 2% o menos, alrededor de 1,5% o menos o alrededor de 1% en peso o menos de.

En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de fosfolípidos de al menos alrededor de 2%, al menos alrededor de 5% o al menos alrededor de 8% en peso. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de fosfolípidos de alrededor de 2% a alrededor de 25%, de alrededor de 2% a alrededor de 20%, de alrededor de 2% a alrededor de 15%, de alrededor de 2% a alrededor de 10%, de alrededor de 5% a alrededor de 25%, de alrededor de 5% a alrededor de 20%, de alrededor de 5% a alrededor de 20%, de alrededor de 5% a alrededor de 10% o de alrededor de 7% a alrededor de 9% en peso. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de fosfolípidos de menos de alrededor de 20%, menos de alrededor de 15%, menos de alrededor de 10%, menos de alrededor de 9% o menos de alrededor de 8% en peso. En algunas realizaciones, el aceite microbiano está sustancialmente libre de fosfolípidos. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende materias insaponificables de menos de alrededor de 2%, menos de alrededor de 1,5%, menos de alrededor de 1% o menos de alrededor de 0,5% en peso del aceite. Las clases de lípidos presentes en el aceite microbiano, tales como una fracción de triacilglicerol, pueden separarse mediante cromatografía de desarrollo rápido y analizarse mediante cromatografía en capa fina (TLC) o separarse y analizarse mediante otros métodos conocidos en la especialidad.

En algunas realizaciones, el aceite microbiano y/o una o más de sus fracciones seleccionadas de la fracción de triacilglicerol, la fracción de ácidos grasos libres, la fracción de esteroides, la fracción de diacilglicerol, y sus

[illegible]

comprende de alrededor de 0,4% a alrededor de 2%, de alrededor de 0,4% a alrededor de 3%, de alrededor de 0,4% a alrededor de 4%, de alrededor de 0,4% a alrededor de 5%, de alrededor de 0,4% a menos de alrededor de 5%, de alrededor de 0,5% a alrededor de 1%, de alrededor de 0,5% a alrededor de 2%, de alrededor de 0,5% a alrededor de 3%, de alrededor de 0,5% a alrededor de 4%, de alrededor de 0,5% a alrededor de 5%, de alrededor de 0,5% a menos de alrededor de 5%, de alrededor de 1% a alrededor de 2%, de alrededor de 1% a alrededor de 3%, de alrededor de 1% a alrededor de 4%, de alrededor de 1% a alrededor de 5% o de alrededor de 1% a menos de alrededor de 5% en peso DPA n-6. En algunas realizaciones, el aceite microbiano y/o una o más de sus fracciones seleccionadas de la fracción de triacilglicerol, la fracción de diacilglicerol, la fracción de esterol, la fracción de ésteres esterólicos, la fracción de ácidos grasos libres, la fracción de fosfolípidos, y sus combinaciones, comprende alrededor de 5%, menos de alrededor de 5%, alrededor de 4% o menos, alrededor de 3% o menos, alrededor de 2% o menos, alrededor de 1% o menos, alrededor de 0,75% o menos, alrededor de 0,6% o menos o alrededor de 0,5% en peso o menos de DPA n-6. En algunas realizaciones, el aceite microbiano y/o una o más de sus fracciones seleccionadas de la fracción de triacilglicerol, la fracción de diacilglicerol, la fracción de esterol, la fracción de ésteres esterólicos, la fracción de ácidos grasos libres, la fracción de fosfolípidos, y sus combinaciones, está sustancialmente libre de DPA n-6. En algunas realizaciones, el aceite microbiano y/o una o más de sus fracciones seleccionadas de la fracción de triacilglicerol, la fracción de diacilglicerol, la fracción de esterol, la fracción de ésteres esterólicos, la fracción de ácidos grasos libres, la fracción de fosfolípidos, y sus combinaciones, comprende ácidos grasos con alrededor de 5% o menos, menos de alrededor de 5%, alrededor de 4% o menos, alrededor de 3% o menos o alrededor de 2% en peso o menos de ácido oleico (18:1 n-9), ácido linoleico (18:2 n-6), ácido linolénico (18:3 n-3), ácido eicosenoico (20:1 n-9), ácido erúico (22:1 n-9), ácido estearidónico (18:4 n-3) o sus combinaciones.

La molécula de triacilglicerol contiene 3 átomos de carbono centrales ($C(sn-1)H_2R1-(sn-2)H_2R2-C(sn-3)H_2R3$), que permiten la formación de diferentes isómeros posicionales. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de triacilglicerol en la que al menos alrededor de 2%, al menos alrededor de 3%, al menos alrededor de 5%, al menos alrededor de 10%, al menos alrededor de 15%, al menos alrededor de 20%, al menos alrededor de 30%, al menos alrededor de 35% o al menos alrededor de 40% de los triacilglicerol en la fracción de triacilglicerol contiene DHA en dos posiciones en el triacilglicerol (DHA disustituido) seleccionadas de dos cualesquiera de las posiciones *sn-1*, *sn-2* y *sn-3*, basándose en el porcentaje de superficie relativo de los picos en un cromatograma de HPLC. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de triacilglicerol en la que de alrededor de 2% a alrededor de 55%, de alrededor de 2% a alrededor de 50%, de alrededor de 2% a alrededor de 45%, de alrededor de 2% a alrededor de 40%, de alrededor de 2% a alrededor de 35%, de alrededor de 2% a alrededor de 30%, de alrededor de 2% a alrededor de 25%, de alrededor de 5% a alrededor de 55%, de alrededor de 5% a alrededor de 50%, de alrededor de 5% a alrededor de 45%, de alrededor de 5% a alrededor de 40%, de alrededor de 5% a alrededor de 35%, de alrededor de 5% a alrededor de 30%, de alrededor de 5% a alrededor de 25%, de alrededor de 10% a alrededor de 55%, de alrededor de 10% a alrededor de 50%, de alrededor de 10% a alrededor de 45%, de alrededor de 10% a alrededor de 40%, de alrededor de 10% a alrededor de 35%, de alrededor de 10% a alrededor de 30%, de alrededor de 10% a alrededor de 25%, de alrededor de 10% a alrededor de 20%, de alrededor de 20% a alrededor de 40%, de alrededor de 20% a alrededor de 35% o de alrededor de 20% a alrededor de 25% de los triacilglicerol en la fracción de triacilglicerol contiene EPA en dos posiciones en el triacilglicerol seleccionadas de dos cualesquiera de las posiciones *sn-1*, *sn-2* o *sn-3*, basándose en el porcentaje de superficie relativo de los picos en un cromatograma de HPLC. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de triacilglicerol en la que al menos alrededor de 0,5%, al menos alrededor de 1%, al menos alrededor de 1,5% o al menos alrededor de 2% de los triacilglicerol en la fracción de triacilglicerol contiene DHA en todas las posiciones *sn-1*, *sn-2* y *sn-3* (DHA trisustituido), basándose en el porcentaje de superficie relativo de los picos en un cromatograma de HPLC. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de triacilglicerol en la que de alrededor de 0,5% a alrededor de 5%, de alrededor de 0,5% a alrededor de 3%, de alrededor de 0,5% a alrededor de 2,5%, de alrededor de 0,5% a alrededor de 2%, de alrededor de 1% a alrededor de 5%, de alrededor de 1% a alrededor de 3% o de alrededor de 1% a alrededor de 2% de los triacilglicerol en la fracción de triacilglicerol contiene DHA en todas las posiciones *sn-1*, *sn-2* y *sn-3*, basándose en el porcentaje de superficie relativo de los picos en un cromatograma de HPLC. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de triacilglicerol en la que al menos alrededor de 10%, al menos alrededor de 15%, al menos alrededor de 20%, al menos alrededor de 25%, al menos alrededor de 30%, al menos alrededor de 35%, al menos alrededor de 40%, al menos alrededor de 45%, al menos alrededor de 50%, al menos alrededor de 55% o al menos alrededor de 60% de los triacilglicerol en la fracción de triacilglicerol contiene DHA en una posición en el triacilglicerol seleccionada de una cualquiera de las posiciones *sn-1*, *sn-2* o *sn-3*, basándose en el porcentaje de superficie relativo de los picos en un cromatograma de HPLC. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de triacilglicerol en la que de alrededor de 10% a alrededor de 80%, de alrededor de 10% a alrededor de 70%, de alrededor de 10% a alrededor de 60%, de alrededor de 15% a alrededor de 80%, de alrededor de 15% a alrededor de 75%, de alrededor de 15% a alrededor de 70%, de alrededor de 15% a alrededor de 65%, de alrededor de 15% a alrededor de 60%, de alrededor de 35% a alrededor de 80%, de alrededor de 35% a alrededor de 75%, de alrededor de 35% a alrededor de 65%, de alrededor de 35% a alrededor de 60%, de alrededor de 40% a alrededor de 80%, de alrededor de 40% a alrededor de 75%, de alrededor de 40% a alrededor de 70%, de alrededor de 40% a alrededor de 65%, de alrededor de 40% a alrededor de 60% o de alrededor de 40% a alrededor de 55% de los triacilglicerol en la fracción de triacilglicerol contiene DHA en una posición en el triacilglicerol seleccionada de una cualquiera de las posiciones *sn-1*, *sn-2* y *sn-3*, basándose en el porcentaje de superficie relativo de los picos en un cromatograma de HPLC.

La presente invención se dirige además a métodos para producir aceites microbianos. En algunas realizaciones, el método comprende desarrollar un traustoitrido de la divulgación en un cultivo para producir una biomasa y extraer de la biomasa un aceite que comprende ácidos grasos omega-3. El aceite se puede extraer de una biomasa recientemente recogida o se puede extraer de una biomasa previamente recogida que se ha almacenado bajo condiciones que eviten el deterioro. Se pueden usar métodos conocidos para cultivar un traustoitrido de la divulgación, para aislar una biomasa del cultivo, para extraer un aceite microbiano de la biomasa y para analizar el perfil de ácidos grasos de aceites extraídos de la biomasa. Véase, p. ej., la Patente de EE. UU. Nº 5.130.242.

La invención se dirige además a un aceite microbiano que comprende un perfil de ácidos grasos de la invención. Un aceite microbiano de la invención puede ser cualquier aceite derivado de un microorganismo, incluyendo, por ejemplo: un aceite crudo extraído de la biomasa del microorganismo sin procesamiento adicional; un aceite refinado que se obtiene al tratar un aceite microbiano crudo con etapas de procesamiento adicionales tales como refinado, blanqueo y/o desodorización; un aceite microbiano diluido obtenido al diluir un aceite microbiano crudo o refinado; o un aceite enriquecido que se obtiene, por ejemplo, al tratar un aceite microbiano crudo o refinado con métodos de purificación adicionales para incrementar la concentración de un ácido graso (tal como DHA) en el aceite.

En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de ésteres esterólicos de alrededor de 0%, al menos alrededor de 0,1%, al menos alrededor de 0,2%, al menos alrededor de 0,5%, al menos alrededor de 1%, al menos alrededor de 1,5%, al menos alrededor de 2% o al menos alrededor de 5% en peso. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de ésteres esterólicos de alrededor de 0% a alrededor de 1,5%, de alrededor de 0% a alrededor de 2%, de alrededor de 0% a alrededor de 5%, de alrededor de 1% a alrededor de 1,5%, de alrededor de 0,2% a alrededor de 1,5%, de alrededor de 0,2% a alrededor de 2% o de alrededor de 0,2% a alrededor de 5% en peso. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de ésteres esterólicos de menos de alrededor de 5%, menos de alrededor de 4%, menos de alrededor de 3% o menos de alrededor de 2% en peso. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de triglicéridos de al menos alrededor de 65%, al menos alrededor de 70%, al menos alrededor de 75%, al menos alrededor de 80%, al menos alrededor de 85% o al menos alrededor de 90% en peso. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de triglicéridos de alrededor de 65% a alrededor de 95%, de alrededor de 75% a alrededor de 95% o de alrededor de 80% a alrededor de 95% en peso o alrededor de 97% en peso o alrededor de 98% en peso. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de ácidos grasos libres de al menos alrededor de 0,5%, al menos alrededor de 1%, al menos alrededor de 1,5%, al menos alrededor de 2%, al menos alrededor de 2,5% o al menos alrededor de 5% en peso. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de ácidos grasos libres de alrededor de 0,5% a alrededor de 5%, de alrededor de 0,5% a alrededor de 2,5%, de alrededor de 0,5% a alrededor de 2%, de alrededor de 0,5% a alrededor de 1,5%, de alrededor de 0,5% a alrededor de 1%, de alrededor de 1% a alrededor de 2,5%, de alrededor de 1% a alrededor de 5%, de alrededor de 1,5% a alrededor de 2,5%, de alrededor de 2% a alrededor de 2,5% o de alrededor de 2% a alrededor de 5% en peso. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de ácidos grasos libres de menos de alrededor de 5%, menos de alrededor de 4%, menos de alrededor de 3%, menos de alrededor de 2% o menos de alrededor de 1% en peso. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de esteroides de al menos alrededor de 0,5%, al menos alrededor de 1%, al menos alrededor de 1,5%, al menos alrededor de 2% o al menos alrededor de 5% en peso. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de esteroides de alrededor de 0,5% a alrededor de 1,5%, de alrededor de 1% a alrededor de 1,5%, de alrededor de 0,5% a alrededor de 2%, de alrededor de 0,5% a alrededor de 5%, de alrededor de 1% a alrededor de 2% o de alrededor de 1% a alrededor de 5% en peso. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de esteroides de menos de alrededor de 5%, menos de alrededor de 4%, menos de alrededor de 3%, menos de alrededor de 2% o menos de alrededor de 1% en peso. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de diglicéridos de al menos alrededor de 1,5%, al menos alrededor de 2%, al menos alrededor de 2,5%, al menos alrededor de 3%, al menos alrededor de 3,5% o al menos alrededor de 5% en peso. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende a fracción de diglicéridos de alrededor de 1,5% a alrededor de 3%, de alrededor de 2% a alrededor de 3%, de alrededor de 1,5% a alrededor de 3,5%, de alrededor de 1,5% a alrededor de 5%, de alrededor de 2,5% a alrededor de 3%, de alrededor de 2,5% a alrededor de 3,5% o de alrededor de 2,5% a alrededor de 5% en peso. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende materiales insaponificables de menos de alrededor de 2%, menos de alrededor de 1,5%, menos de alrededor de 1% o menos de alrededor de 0,5% en peso del aceite. Las clases de lípidos presentes en el aceite microbiano, tales como la fracción de triglicéridos, pueden separarse mediante cromatografía de desarrollo rápido y analizarse mediante cromatografía en capa fina (TLC) o separarse y analizarse mediante otros métodos conocidos en la especialidad.

En algunas realizaciones, el aceite microbiano y/o una o más de sus fracciones seleccionadas de la fracción de triglicéridos, la fracción de ácidos grasos libres, la fracción de esteroides, la fracción de diglicéridos, y sus combinaciones, comprende al menos alrededor de 40%, al menos alrededor de 45%, al menos alrededor de 50%, al menos alrededor de 55%, al menos alrededor de 60%, al menos alrededor de 65%, al menos alrededor de 70%, al menos alrededor de 75% o al menos alrededor de 80% en peso de DHA. En algunas realizaciones, el aceite microbiano y/o una o más de sus fracciones seleccionadas de la fracción de triglicéridos, la fracción de ácidos grasos libres, la fracción de esteroides, la fracción de diglicéridos, y sus combinaciones, comprende de alrededor de 40% a alrededor de 45%, de alrededor de 40% a alrededor de 50%, de alrededor de 40% a alrededor de 60%, de alrededor de 50% a alrededor de 60%, de alrededor de 55% a alrededor de 60%, de alrededor de 40% a alrededor de 65%, de alrededor

de 50% a alrededor de 65%, de alrededor de 55% a alrededor de 65%, de alrededor de 40% a alrededor de 70%, de alrededor de 40% a alrededor de 80%, de alrededor de 50% a alrededor de 80%, de alrededor de 55% a alrededor de 80%, alrededor de 60% a alrededor de 80% o de alrededor de 70% a alrededor de 80% en peso de DHA. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de ésteres esterólicos que comprende alrededor de 45% o menos, alrededor de 40% o menos, alrededor de 35% o menos, alrededor de 30% o menos, alrededor de 25% o menos, alrededor de 20% o menos, alrededor de 15% o menos o alrededor de 13% en peso o menos de DHA. En algunas realizaciones, el aceite microbiano y/o una o más de sus fracciones seleccionadas de la fracción de triglicéridos, la fracción de ácidos grasos libres, la fracción de esteroides, la fracción de diglicéridos, y sus combinaciones, comprende alrededor de 10% o menos, alrededor de 9% o menos, alrededor de 8% o menos, alrededor de 7% o menos, alrededor de 6% o menos, alrededor de 5% o menos, alrededor de 4% o menos, alrededor de 3% o menos, alrededor de 2% o menos o alrededor de 1% en peso o menos de EPA. En algunas realizaciones, el aceite microbiano y/o una o más de sus fracciones seleccionadas de la fracción de triglicéridos, la fracción de ácidos grasos libres, la fracción de esteroides, la fracción de diglicéridos, y sus combinaciones, comprende de alrededor de 2% a alrededor de 3%, de alrededor de 2% a alrededor de 3,5%, de alrededor de 2,5% a alrededor de 3,5%, de alrededor de 2% a alrededor de 6%, de alrededor de 2,5% a alrededor de 6%, de alrededor de 3,0% a alrededor de 6%, de alrededor de 3,5% a alrededor de 6%, de alrededor de 5% a alrededor de 6% o de alrededor de 2% a alrededor de 10% en peso EPA. En algunas realizaciones, el aceite microbiano y/o una o más de sus fracciones seleccionadas de la fracción de ésteres esterólicos, 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 sus combinaciones, está sustancialmente libre de EPA. En algunas realizaciones, el aceite microbiano y/o una o más de sus fracciones seleccionadas de la fracción de ésteres esterólicos, 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 sus combinaciones, comprende una relación en peso de DHA a EPA de al menos alrededor de 5:1, al menos alrededor de 7:1, al menos alrededor de 9:1, al menos alrededor de 10:1, al menos alrededor de 15:1, al menos alrededor de 20:1, al menos alrededor de 25:1, al menos alrededor de 30:1 o al menos alrededor de 50:1, en donde el aceite microbiano y/o una o más de sus fracciones comprenden 10% en peso o menos de EPA. En algunas realizaciones, el aceite microbiano y/o una o más de sus fracciones seleccionadas de la fracción de ésteres esterólicos, 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 sus combinaciones, comprende una relación en peso de DHA a EPA de al menos alrededor de 5:1, pero menos de alrededor de 20:1. En algunas realizaciones, la relación en peso de DHA a EPA es de alrededor de 5:1 a alrededor de 18:1, de alrededor de 7:1 a alrededor de 16:1 o de alrededor de 10:1 a alrededor de 15:1. En algunas realizaciones, el aceite microbiano y/o una o más de sus fracciones seleccionadas de la fracción de ésteres esterólicos, 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 sus combinaciones, comprende de alrededor de 0,1% a alrededor de 0,25%, de alrededor de 0,2% a alrededor de 0,25%, de alrededor de 0,1% a alrededor de 0,5% o de alrededor de 0,1% a alrededor de 1,5% en peso de ARA. En algunas realizaciones, el aceite microbiano y/o una o más de sus fracciones seleccionadas de la fracción de ésteres esterólicos, 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 sus combinaciones, comprende alrededor de 1,5% o menos, alrededor de 1% o menos, alrededor de 0,5% o menos, alrededor de 0,2% o menos o alrededor de 0,1% en peso o menos de ARA. En algunas realizaciones, el aceite microbiano y/o una o más de sus fracciones seleccionadas de la fracción de ésteres esterólicos, 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 sus combinaciones, está sustancialmente libre de ARA. En algunas realizaciones, el aceite microbiano y/o una o más de sus fracciones seleccionadas de la fracción de ésteres esterólicos, la fracción de triglicéridos, la fracción de ácidos grasos libres, la fracción de diglicéridos, la fracción polar (incluyendo la fracción de fosfolípidos), y sus combinaciones, comprende una relación en peso de DHA a ARA de al menos alrededor de 20:1, al menos alrededor de 30:1, al menos alrededor de 35:1, al menos alrededor de 40:1, al menos alrededor de 60:1, al menos alrededor de 80:1, al menos alrededor de 100:1, al menos alrededor de 150:1, al menos alrededor de 200:1, al menos alrededor de 250:1 o al menos alrededor de 300:1. En algunas realizaciones, el aceite microbiano y/o una o más de sus fracciones seleccionadas de la fracción de ésteres esterólicos, 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 sus combinaciones, comprende de alrededor de 0,5% a alrededor de 1%, de alrededor de 0,5% a alrededor de 2%, de alrededor de 0,5% a alrededor de 2,5%, de alrededor de 0,5% a alrededor de 3%, de alrededor de 0,5% a alrededor de 3,5%, de alrededor de 0,5% a alrededor de 5%, de alrededor de 0,5% a alrededor de 6%, de alrededor de 1% a alrededor de 2%, de alrededor de 2% a alrededor de 3%, de alrededor de 2% a alrededor de 3,5%, de alrededor de 1% a alrededor de 2,5%, de alrededor de 1% a alrededor de 3%, de alrededor de 1% a alrededor de 3,5%, de alrededor de 1% a alrededor de 5% o de alrededor de 1% a alrededor de 6% en peso de DPA n-6. En algunas realizaciones, el aceite microbiano y/o una o más de sus fracciones seleccionadas de la fracción de ésteres esterólicos, 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 sus combinaciones, comprende alrededor de 6% o menos, alrededor de 5% o menos, alrededor de 3% o menos, alrededor de 2,5% o menos, alrededor de 2% o menos, alrededor de 1% o menos o alrededor de 0,5% en peso o menos de DPA n-6. En algunas realizaciones, el aceite microbiano y/o una o más de sus fracciones seleccionadas de la fracción de ésteres esterólicos, 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 sus combinaciones, está sustancialmente libre de DPA n-6. En algunas realizaciones, el aceite microbiano y/o una o más de sus fracciones seleccionadas de la

fracción de ésteres esterólicos, 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 sus combinaciones, comprende una relación en peso de DHA a DPA n-6 de más de alrededor de 6:1, de al menos alrededor de 8:1, al menos alrededor de 10:1, al menos alrededor de 15:1, al menos alrededor de 20:1, al menos alrededor de 25:1, al menos alrededor de 50:1 o al menos alrededor de 100:1. En algunas realizaciones, el aceite microbiano y/o una o más de sus fracciones seleccionadas de la fracción de ésteres esterólicos, 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 sus combinaciones, comprende alrededor de 5% o menos, alrededor de 4% o menos, alrededor de 3% o menos, alrededor de 2% o menos, alrededor de 1,5% o menos, alrededor de 1% o menos o alrededor de 0,5% en peso o menos de cada uno de ácido linoleico (18:2 n-6), ácido linolénico (18:3 n-3), ácido eicosenoico (20:1 n-9) y ácido erúcico (22:1 n-9). En algunas realizaciones, el aceite microbiano y/o una o más de sus fracciones seleccionadas de la fracción de ésteres esterólicos, 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 sus combinaciones, comprende alrededor de 5% o menos, alrededor de 4% o menos, alrededor de 3% o menos, alrededor de 2% o menos, alrededor de 1,5% o menos o alrededor de 1% en peso o menos de ácido heptadecanoico (17:0). En algunas realizaciones, el aceite microbiano y/o una o más de sus fracciones comprenden de alrededor de 0,01% a alrededor de 5% en peso, de alrededor de 0,05% a alrededor de 3% en peso o de alrededor de 0,1% a alrededor de 1% en peso de ácido heptadecanoico.

La molécula de triglicérido contiene 3 átomos de carbono centrales ($C_{sn-1}H_2R1-C_{sn-2}H_2R2-C_{sn-3}H_2R3$), que permiten la formación de diferentes isómeros posicionales. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de triglicéridos en la que al menos alrededor de 20%, al menos alrededor de 30%, al menos alrededor de 35% o al menos alrededor de 40% de los triglicéridos en la fracción de triglicéridos contiene DHA en dos posiciones en el triglicérido (DHA disustituido) seleccionadas de dos cualesquiera de las posiciones *sn-1*, *sn-2* y *sn-3*, basándose en el porcentaje de superficie relativo de los picos en un cromatograma de HPLC. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de triglicéridos en la que de alrededor de 20% a alrededor de 40%, de alrededor de 20% a alrededor de 35%, de alrededor de 30% a alrededor de 40% o de alrededor de 30% a alrededor de 35% de los triglicéridos en la fracción de triglicéridos contiene DHA en dos posiciones en el triglicérido seleccionadas de dos cualesquiera de las posiciones *sn-1*, *sn-2* o *sn-3*, basándose en el porcentaje de superficie relativo de los picos en un cromatograma de HPLC. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de triglicéridos en la que al menos alrededor de 5%, al menos alrededor de 10%, al menos alrededor de 15% o al menos alrededor de 20% de los triglicéridos en la fracción de triglicéridos contiene DHA en todas las posiciones *sn-1*, *sn-2* y *sn-3* (DHA trisustituido), basándose en el porcentaje de superficie relativo de los picos en un cromatograma de HPLC. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de triglicéridos en la que de alrededor de 5% a alrededor de 20%, de alrededor de 5% a alrededor de 15%, de alrededor de 10% a alrededor de 20% o de alrededor de 10% a alrededor de 15% de los triglicéridos en la fracción de triglicéridos contiene DHA en todas las posiciones *sn-1*, *sn-2* y *sn-3*, basándose en el porcentaje de superficie relativo de los picos en un cromatograma de HPLC. En contraste, la especie de TAG presentada en la Patente de EE. UU. Nº 6.582.941 no contiene DHA en las tres posiciones. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de triglicéridos en la que al menos alrededor de 50%, al menos alrededor de 55%, al menos alrededor de 60%, al menos alrededor de 65%, al menos alrededor de 70% o al menos alrededor de 75% de los triglicéridos en la fracción de triglicéridos contiene DHA en una posición en el triglicérido seleccionada de una cualquiera de las posiciones *sn-1*, *sn-2* o *sn-3*, basándose en el porcentaje de superficie relativo de los picos en un cromatograma de HPLC. En algunas realizaciones, el aceite microbiano comprende una fracción de triglicéridos en la que de alrededor de 50% a alrededor de 75%, de alrededor de 50% a alrededor de 70%, de alrededor de 50% a alrededor de 65%, de alrededor de 60% a alrededor de 75%, de alrededor de 60% a alrededor de 70% o de alrededor de 60% a alrededor de 65% de los triglicéridos en la fracción de triglicéridos contiene DHA en una posición en el triglicérido seleccionada de una cualquiera de las posiciones *sn-1*, *sn-2* y *sn-3*, basándose en el porcentaje de superficie relativo de los picos en un cromatograma de HPLC.

Composiciones

La divulgación se dirige a composiciones que comprenden un microorganismo de la divulgación, una biomasa aislada de la invención, un aceite microbiano de la invención o sus combinaciones.

Un microorganismo, una biomasa o un aceite microbiano de la divulgación se pueden modificar o procesar químicamente o físicamente de forma adicional basándose en los requisitos de la composición mediante cualquier técnica conocida.

Las células o biomazas del microorganismo se pueden secar antes del uso en una composición mediante métodos que incluyen, pero no se limitan a, criosecado, secado al aire, secado por pulverización, secado en túnel, secado a vacío (liofilización) y un procedimiento similar. Alternativamente, una biomasa recogida y lavada se puede usar directamente en una composición sin secado. Véanse, p. ej., las Patentes de EE. UU. Nº 5.130.242 y 6.812.009.

Los aceites microbianos de la invención se pueden usar como materia prima para producir más eficazmente un producto enriquecido en un ácido graso tal como EPA. Por ejemplo, los aceites microbianos de la invención se pueden

someter a diversas técnicas de purificación conocidas en la especialidad, tales como destilación o aducción con urea, para producir un producto de potencia superior con concentraciones superiores de EPA u otro ácido graso. Los aceites microbianos de la invención también se pueden usar en reacciones químicas para producir compuestos derivados de ácidos grasos en los aceites, tales como ésteres y sales de EPA u otro ácido graso.

Una composición de la divulgación puede incluir uno o más excipientes. Según se usa en la presente, "excipiente" se refiere a un componente o una mezcla de componentes, que se usa en una composición de la presente divulgación para dar características deseables a la composición, incluyendo alimentos así como composiciones farmacéuticas, cosméticas e industriales. Un excipiente de la presente divulgación se puede describir como un excipiente "farmacéuticamente aceptable" cuando se añade a una composición farmacéutica, lo que significa que el excipiente es un compuesto, un material, una composición, una sal y/o una forma de dosificación que es, dentro del alcance de un juicio médico razonable, adecuado para el contacto con tejidos de seres humanos y animales no humanos sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otras complicaciones problemáticas excesivas a lo largo de la duración deseada de contacto acorde con una relación razonable de beneficio/riesgo. En algunas realizaciones, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o uno estatal o listado en la Farmacopea de EE. UU. u otra farmacopea internacional generalmente reconocida para el uso en animales, y más particularmente en seres humanos. Se pueden usar diversos excipientes. En algunas realizaciones, el excipiente puede ser, pero no se limita a, un agente alcalino, un estabilizante, un antioxidante, un agente de adhesión, un agente separador, un agente de revestimiento, un componente de una fase exterior, un componente de liberación controlada, un disolvente, un tensioactivo, un humectante, un agente tamponador, una carga, un emoliente o sus combinaciones. Excipientes además de los analizados en la presente pueden incluir los excipientes listados en, aunque no limitados a, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21^o ed. (2005). La inclusión de un excipiente en una clasificación particular de la presente (p. ej., "disolvente") está destinada a ilustrar en lugar de limitar el papel del excipiente. Un excipiente particular se puede encontrar dentro de múltiples clasificaciones.

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

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

En algunas realizaciones, un microorganismo, una biomasa o un aceite microbiano de la divulgación se puede usar directamente como o incluirse como un aditivo con uno o más de: un aceite, un aderezo, un unte, otro ingrediente graso, una bebida, una salsa, un alimento lácteo a base de soja (tal como leche, yogur, queso y helado), un artículo horneado, un producto nutricional, p. ej., como un complemento nutricional (en forma de cápsula o comprimido), un complemento vitamínico, un suplemento dietético, una bebida en polvo y un producto alimenticio en polvo acabado o semiacabado. En algunas realizaciones, el complemento nutricional está en la forma de una cápsula vegetariana que no está formada por y no contiene componentes procedentes de una fuente animal.

Una lista parcial de composiciones alimenticias que pueden incluir un aceite microbiano de la invención incluye, pero no se limita a, productos a base de soja (leches, helados, yogures, bebidas, cremas, untes, blanqueadores); sopas y mezclas para sopa; masas, rebozos y artículos alimenticios horneados incluyendo, por ejemplo, productos de panadería fina, cereales de desayuno, tartas, tartas de queso, empanadas, magdalenas, galletas, barras, panes, rollitos, bizcochos, panecillos, pasteles, bollos, picatostes, galletas saladas, artículos dulces, galletas de aperitivo, empanadas, barras de granola/aperitivo y pasteles tostados; caramelos; confituras duras; chocolate y otras confituras; goma de mascar; productos alimenticios líquidos, por ejemplo leches, bebidas energéticas, leche maternizada, bebidas carbonatadas, té, comidas líquidas, zumos de fruta, bebidas a base de fruta, bebidas a base de hortalizas; jarabes multivitaminados, sustitutos de comidas, alimentos medicinales, y jarabes; mezclas de bebida en polvo; pasta; productos de pescado procesados; productos cárnicos procesados; productos de pollo procesados; salsas de carne y salsas; condimentos (kétchup, mayonesa, etc.); untes basados en aceites vegetales; productos lácteos; yogur; mantequillas; productos lácteos congelados; helados; postres congelados; yogures congelados; productos alimenticios semisólidos tales como comida para bebés; pudines y postres de gelatina; queso procesado y no procesado; mezclas para tortitas; barras alimenticias incluyendo barras energéticas; mezclas para gofres; aderezos para ensaladas; mezclas de huevo de sustitución; untes de nuez y basados en nuez; aperitivos salados tales como patatas fritas de bolsa y otros fritos o crujientes, fritos de maíz, fritos de tortilla, aperitivos extruidos, palomitas, pretzels, crujientes de patata, y nueces; y aperitivos especiales tales como aperitivos para mojar, aperitivos de fruta seca, aperitivos de carne, cortezas de cerdo, barras alimenticias saludables y tortas de arroz/maíz.

En algunas realizaciones, un aceite microbiano de la invención se puede usar para complementar leche maternizada. La leche maternizada se puede complementar con un aceite microbiano de la invención solo o en combinación con un aceite físicamente refinado derivado de un microorganismo productor de ácido araquidónico (ARA). Un

microorganismo productor de ARA, por ejemplo, es *Mortierella alpina* o *Mortierella* sect. *schmuckeri*. Alternativamente, las leches maternizadas se pueden complementar con un aceite microbiano de la invención en combinación con un aceite rico en ARA, incluyendo ARASCO® (Marteck Biosciences, Columbia, MD).

5 En algunas realizaciones, la composición es un alimento para animales. Un "animal" incluye organismos no humanos pertenecientes al reino Animalia, e incluye, sin limitación, animales acuáticos y animales terrestres. El "pienso" o "alimento para animales" se refiere a cualquier alimento destinado a animales no humanos, ya sea para peces; peces comerciales; peces ornamentales; larvas de pez; bivalvos; moluscos; crustáceos; marisco; gambas; larvas de gamba; artemia; rotíferos; artemia salina; filtradores; anfibios; reptiles; mamíferos; animales domésticos; animales de granja; animales de zoológico; animales deportivos; ganado reproductor; animales para carreras; animales de exhibición; animales "reliquia"; animales raros o en peligro de extinción; animales de compañía; mascotas tales como perros, gatos, cobayas, conejos, ratas, ratones o caballos; primates tales como monos (p. ej., cebus, rhesus, verde africano, patas, cynomolgus y cercopithecus), monos sin cola, orangutanes, babuinos, gibones y chimpancés; cánidos tales como perros y lobos; felinos tales como gatos, leones y tigres; équidos tales como caballos, burros y cebras; animales para alimento tales como vacas, ganado vacuno, cerdos y ovejas; ungulados tales como ciervos y jirafas; o roedores tales como ratones, ratas, hámsteres y cobayas; etc. Un pienso incluye, pero no se limita a, un pienso para piscicultura, un pienso para animales domésticos incluyendo un pienso para perros, un pienso para animales de zoológico, un pienso para animales de trabajo, un pienso para ganado y sus combinaciones.

20 En algunas realizaciones, la composición es un pienso o complemento para piensos para cualquier animal cuya carne o productos sean consumidos por seres humanos, tales como cualquier animal del que la carne, los huevos o la leche se deriven para consumo humano. Cuando se aportan como alimento a estos animales, nutrientes tales como LC-PUFAs se pueden incorporar a la carne, la leche, los huevos y otros productos de estos animales para incrementar su contenido de estos nutrientes.

25 En algunas realizaciones, la composición es un material secado por pulverización que se puede triturar para formar partículas de un tamaño apropiado para el consumo por zooplancton, artemia, rotíferos y filtradores. En algunas realizaciones, el zooplancton, la artemia o los rotíferos alimentados con la composición sirven a su vez como alimento a larvas de pez, peces, mariscos, bivalvos o crustáceos.

30 En algunas realizaciones, la composición es una composición farmacéutica. Composiciones farmacéuticas adecuadas incluyen, pero no se limitan a una composición antiinflamatoria, un fármaco para el tratamiento de cardiopatía coronaria, un fármaco para el tratamiento de la arteriosclerosis, un agente quimioterapéutico, un excipiente activo, un fármaco para la osteoporosis, un antidepresivo, un anticonvulsivo, un fármaco contra *Helicobacter pylori*, un fármaco para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa, un fármaco para el tratamiento de hepatopatía degenerativa, un antibiótico, una composición reductora del colesterol y una composición reductora de triacilglicerolos. En algunas realizaciones, la composición es un alimento médico. Un alimento médico incluye un alimento que es una composición que se va a consumir o administrar externamente bajo la supervisión de un médico y que está destinado al manejo dietético específico de una afección, para la que requisitos nutricionales distintivos, basados en principios científicos reconocidos, son establecidos mediante evaluación médica.

45 En algunas realizaciones, el aceite microbiano se puede formular en una forma de dosificación. Las formas de dosificación pueden incluir, pero no se limitan a, comprimidos, cápsulas, obleas, pellas, píldoras, polvos y gránulos, y formas de dosificación parenterales, que incluyen, pero no se limitan a, soluciones, suspensiones, emulsiones y polvos secos que comprenden una cantidad eficaz del aceite microbiano. También se sabe en la técnica que estas formulaciones también pueden contener diluyentes, cargas, desintegrantes, aglutinantes, lubricantes, tensioactivos, vehículos hidrófobos, vehículos hidrosolubles, emulsionantes, tampones, humectantes, hidratantes, solubilizantes, conservantes y similares farmacéuticamente aceptables. Las formas de administración pueden incluir, pero no se limitan a, comprimidos, grageas, cápsulas, comprimidos oblongos y píldoras, que contienen el aceite microbiano y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables adecuados.

50 Para la administración oral, el aceite microbiano se puede combinar con portadores farmacéuticamente aceptables muy conocidos en la especialidad. Estos portadores permiten que los aceites microbianos de la invención se formulen como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, lechadas, suspensiones y similares, para la ingestión oral por un sujeto que se va a tratar. En algunas realizaciones, la forma de dosificación es un comprimido, una píldora o un comprimido oblongo. Las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener al añadir un excipiente sólido, opcionalmente molar la mezcla resultante, y procesar la mezcla de gránulos, después de añadir adyuvantes adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de gragea. Excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, cargas tales como azúcares, incluyendo, pero no limitados a, lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, pero no limitadas a, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes desintegrantes, tales como, pero no limitados a, la polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido alginico o una de sus sales tales como alginato sódico. Preparaciones farmacéuticas que se pueden usar oralmente incluyen, pero no se limitan a, cápsulas ajustadas a presión hechas de gelatina, así como cápsulas selladas blandas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. En algunas realizaciones, la forma de dosificación es una forma de dosificación vegetariana, en la que la forma de

dosificación no se forma a partir de y no contiene componentes procedentes de una fuente animal. En algunas realizaciones, la forma de dosificación vegetariana es una cápsula vegetariana.

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

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

Métodos de Uso de las Composiciones

15 En algunas realizaciones, las composiciones se pueden usar para el tratamiento de una afección en seres humanos o animales no humanos. En algunas realizaciones, las composiciones se pueden usar para la nutrición en seres humanos o animales no humanos.

20 Los términos "tratar" y "tratamiento" se refieren tanto a un tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en donde el objeto es prevenir o frenar (acortar) una afección fisiológica, una enfermedad o un trastorno no deseados u obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. Para los propósitos de esta divulgación, resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, alivio o eliminación de los síntomas o los signos asociados con una afección, una enfermedad o un trastorno; la disminución del grado de una afección, una enfermedad o un trastorno; la estabilización de una afección, una enfermedad o un trastorno, (es decir, cuando la afección, la enfermedad o el trastorno no está empeorando); el retardo en el comienzo o el avance de la afección, la enfermedad o el trastorno; la mejora de la afección, la enfermedad o el trastorno; la remisión (ya sea parcial o total y ya sea detectable o indetectable) de la afección, la enfermedad o el trastorno; o la recuperación o mejora de una afección, una enfermedad o un trastorno. Tratamiento incluye provocar una respuesta clínicamente significativa sin efectos secundarios excesivos. El tratamiento también incluye prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento.

30 En algunas realizaciones, la composición se usa para tratar una afección, una enfermedad o un trastorno tal como acné, inflamación aguda, maculopatía asociada a la edad, alergia, enfermedad de Alzheimer, artritis, asma, aterosclerosis, una enfermedad autoinmunitaria, un trastorno lipídico sanguíneo, quistes mamarios, caquexia, cáncer, reestenosis cardíaca, cardiopatías, inflamación crónica, cardiopatía coronaria, fibrosis quística, trastorno degenerativo del hígado, diabetes, eccema, un trastorno gastrointestinal, una cardiopatía, niveles altos de triacilglicérols, hipertensión, hiperactividad, enfermedades inmunológicas, inhibición del desarrollo tumoral, afecciones inflamatorias, trastornos intestinales, disfunción renal, leucemia, depresión mayor, esclerosis múltiple, un trastorno neurodegenerativo, osteoartritis, osteoporosis, un trastorno peroxisomático, preeclampsia, parto prematuro, psoriasis, trastorno pulmonar, artritis reumatoide, riesgo de ataque cardíaco o trombosis.

40 En algunas realizaciones, la composición se usa para incrementar la duración de la gestación de un feto en el tercer trimestre.

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

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

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

50 La composición o la forma de dosificación se puede administrar al cuerpo de un sujeto mediante cualquier vía compatible con la composición o forma de dosificación. Se considera que una sustancia se "administra" si la sustancia se introduce en el cuerpo del sujeto o si otra persona, una máquina o un dispositivo introduce la sustancia en el cuerpo del sujeto. Por lo tanto, "administración" incluye, p. ej., autoadministración, administración por otros y administración indirecta. El término "continua" o "consecutiva", según se usa en la presente en referencia a la "administración", significa que la frecuencia de administración es al menos una vez al día. Nótese, sin embargo, que la frecuencia de administración puede ser más de una vez al día y sin embargo ser "continua" o "consecutiva", p. ej., dos o incluso tres veces al día, con la condición de no se superen que los niveles de dosificación que se especifican en la presente. Los medios y métodos para la administración se conocen en la especialidad y un experto puede referirse a diversas referencia farmacológicas para guía. Por ejemplo, se pueden consultar "Modern Pharmaceuticals", Banker & Rhodes, Informa Healthcare, USA, 4ª ed. (2002); y "Goodman & Gilman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics", McGraw-Hill Companies, Inc., Nueva York, 10ª ed. (2001).

Por "sujeto", "individuo" o "paciente" se entiende cualquier sujeto, ya sea humano o no humano, del que se desea un diagnóstico, un pronóstico, una terapia o una administración de la composición o forma de dosificación. Sujetos mamíferos incluyen, pero no se limitan a, seres humanos; animales domésticos; animales de granja; animales de zoológico; animales deportivos; mascotas tales como perros, gatos, cobayas, conejos, ratas, ratones o caballos; primates tales como monos (p. ej., cebus, rhesus, verde africano, patas, cynomolgus y cercopithecus), monos sin cola, orangutanes, babuinos, gibones y chimpancés; cánidos tales como perros y lobos; félidos tales como gatos, leones y tigres; équidos tales como caballos, burros y cebras; animales para alimentación tales como vacas, ganado vacuno, cerdos y ovejas; ungulados tales como ciervos y jirafas; roedores tales como ratones, ratas, hámsteres y cobayas; etc. El término sujeto también abarca animales para modelos, p. ej., animales para modelos de enfermedad. En algunas realizaciones, el término sujeto incluye animales valiosos, bien económicamente o de otro modo, p. ej., ganado reproductor económicamente importante, animales de carreras, animales de exhibición, animales "reliquia"; animales raros o en peligro de extinción o animales de compañía. En ciertas realizaciones, el sujeto es un sujeto humano. En ciertas realizaciones, el sujeto es un sujeto no humano.

La composición se puede administrar como una "cantidad nutricional", una "cantidad terapéuticamente eficaz", una "cantidad profilácticamente eficaz" una "dosis terapéutica" o una "dosis profiláctica". Una "cantidad nutricional" se refiere a una cantidad eficaz, en dosificaciones y durante períodos necesarios, para alcanzar un resultado nutricional deseado. Un resultado nutricional puede ser, p. ej., niveles incrementados de un componente de ácido graso deseable en un sujeto. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" o "dosis terapéutica" se refiere a una cantidad eficaz, en dosificaciones y durante períodos necesarios, para alcanzar un resultado terapéutico deseado. Un resultado terapéutico puede ser, p. ej., reducción de síntomas, supervivencia prolongada, movilidad mejorada, y similares. Un resultado terapéutico no necesita ser una "curación". Una "cantidad profilácticamente eficaz" o "dosis profiláctica" se refiere a una cantidad eficaz, en dosificaciones y durante períodos necesarios, para alcanzar el resultado profiláctico deseado. Típicamente, puesto que una dosis profiláctica se usa en sujetos antes de o en una fase temprana de la enfermedad, una cantidad profilácticamente eficaz será menor que una cantidad terapéuticamente eficaz para el tratamiento de una fase avanzada de la enfermedad.

Diversas cantidades de dosificación de la composición, la forma de dosificación o la composición farmacéutica se pueden administrar a un sujeto, basándose en la cantidad de EPA u otro componente de ácido graso del microorganismo, la biomasa o el aceite microbiano que se va a administrar al sujeto. Los términos "dosificación diaria", "nivel de dosificación diaria" y "cantidad de dosificación diaria" se refieren en la presente a la cantidad total de EPA u otro componente de ácido graso administrada al día (por período de 24 horas). Así, por ejemplo, la administración de EPA a un sujeto en una dosificación diaria de 2 mg significa que el sujeto recibe un total de 2 mg de EPA diariamente, se administre el EPA como una sola forma de dosificación que comprende 2 mg de EPA o, alternativamente, cuatro formas de dosificación que comprenden 0,5 mg de EPA cada una (para un total de 2 mg de EPA). En algunas realizaciones, la cantidad diaria de EPA se administra en una sola forma de dosificación o en dos formas de dosificación. Las formas de dosificación de la presente divulgación se pueden tomar en una sola aplicación o múltiples aplicaciones. Por ejemplo, si se toman cuatro comprimidos al día, comprendiendo cada comprimidos 0,5 mg de EPA, entonces se pueden tomar los cuatro comprimidos una vez al día o se pueden tomar 2 comprimidos dos veces al día o se puede tomar 1 comprimido cada 6 horas. En algunas realizaciones, la dosificación diaria es de alrededor de 100 mg a alrededor de 15 g de EPA. En algunas realizaciones, la dosificación diaria es de alrededor de 0,5 mg a alrededor de 250 mg, de alrededor de 100 mg a alrededor de 250 mg, de alrededor de 100 mg a alrededor de 500 mg, de alrededor de 100 mg a alrededor de 1 g, de alrededor de 1 g a alrededor de 2,5 g, de alrededor de 1 g a alrededor de 5 g, de alrededor de 1 g a alrededor de 10 g, de alrededor de 1 g a alrededor de 15 g, de alrededor de 5 g a alrededor de 10 g, de alrededor de 5 g a alrededor de 15 g, de alrededor de 10 g a alrededor de 15 g, de alrededor de 100 mg a alrededor de 10 g, de alrededor de 100 mg a alrededor de 5 g o alrededor de 100 mg a alrededor de 2,5 g de EPA, DHA o una de sus combinaciones. En algunas realizaciones, la composición es una forma de dosificación que comprende de alrededor de 0,5 mg a alrededor de 250 mg, 100 mg a alrededor de 250 mg, de alrededor de 0,5 mg a alrededor de 500 mg, de alrededor de 100 mg a alrededor de 500 mg, de alrededor de 0,5 mg a alrededor de 1 g o alrededor de 100 mg a alrededor de 1 g de EPA, DHA o una de sus combinaciones por forma de dosificación.

La administración de las composiciones o formas de dosificación de la presente divulgación se puede conseguir usando diversos regímenes. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la administración se produce diariamente en días consecutivos o, alternativamente, se produce un día sí y uno no (cada dos días). La administración se puede producir durante uno o más días.

La administración de las composiciones y las formas de dosificación se puede combinar con otros regímenes usados para el tratamiento de la afección. Por ejemplo, el método de la presente divulgación se puede combinar con regímenes dietéticos (p. ej., dietas bajas en carbohidratos, dietas altas en proteínas, dietas altas en fibras, etc.), regímenes de ejercicio, regímenes para perder peso, regímenes para dejar de fumar o sus combinaciones. El método de la presente divulgación también se puede usar en combinación con otros productos farmacéuticos en el tratamiento de la afección. Las composiciones o las formas de dosificación de la presente divulgación se pueden administrar antes o después de otros regímenes o productos farmacéuticos.

Estuches Que comprenden las Composiciones

La divulgación se dirige a estuches o paquetes que contienen una o más unidades de una composición de la divulgación. Los estuches o paquetes pueden incluir unidades de un producto alimenticio, una composición farmacéutica, una composición cosmética o industrial que comprende el microorganismo, la biomasa o el aceite microbiano de la divulgación, o sus combinaciones. Los estuches o paquetes también pueden incluir un aditivo que comprende el microorganismo, la biomasa o el aceite microbiano de la divulgación, o sus combinaciones, para la preparación de una composición alimenticia, cosmética, farmacéutica o una composición industrial.

En algunas realizaciones, el estuche o paquete contiene una o más unidades de una composición farmacéutica para ser administrada según los métodos de la presente divulgación. El estuche o paquete puede contener una unidad de dosificación o más de una unidad de dosificación (es decir, múltiples unidades de dosificación). Si están presentes múltiples unidades de dosificación en el estuche o envase, las múltiples unidades de dosificación se pueden disponer opcionalmente para una administración secuencial.

Los estuches de la presente divulgación pueden contener opcionalmente instrucciones asociadas con las unidades o formas de dosificación de los estuches. Estas instrucciones pueden estar en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regule la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos, notificación que refleja la aprobación por la agencia de la fabricación, el uso o la venta para la administración a seres humanos para tratar una afección o un trastorno. Las instrucciones pueden estar en cualquier forma que contenga información sobre el uso de las unidades o formas de dosificación en el estuche según los métodos de la divulgación. Por ejemplo, las instrucciones pueden estar en la forma de un impreso o en la forma de un dispositivo de medios pregrabado.

En el transcurso del examen de un paciente, un profesional médico puede determinar que la administración de uno de los métodos de la presente divulgación es apropiada para un paciente o el médico puede determinar que la afección del paciente se puede mejorar mediante la administración de uno de los métodos de la presente divulgación. Antes de prescribir cualquier régimen, el médico pueden aconsejar al paciente, por ejemplo, sobre los diversos riesgos y beneficios asociados con el régimen. Al paciente se le puede proporcionar una divulgación completa de todos los riesgos conocidos y presuntos asociados con el régimen. Tal consejo se puede proporcionar verbalmente, así como en forma escrita. En algunas realizaciones, el médico puede proporcionar al paciente materiales bibliográficos sobre el régimen, tal como información del producto, materiales educativos y similares.

La presente divulgación se dirige a métodos para educar a los consumidores acerca de los métodos de tratamiento, comprendiendo el método distribuir las formas de dosificación con información al consumidor en un punto de venta. En algunas realizaciones, la distribución se producirá en un punto de venta que tiene un farmacéutico o profesional sanitario.

El término "información al consumidor" puede incluir, pero no se limita a, un texto en inglés, un texto en lengua no inglesa, una imagen visual, un gráfico, una grabación telefónica, un cbersitio y el acceso a un representante de atención al paciente en vivo. En algunas realizaciones, la información al consumidor proporcionará directrices para el uso de las formas de dosificación según los métodos de la presente divulgación, uso en edades apropiadas, la indicación, contraindicaciones, la dosificación apropiada, advertencias, número de teléfono y dirección del cbersitio. En algunas realizaciones, el método comprende además proporcionar información profesional a personas pertinentes en posición de responder preguntas relativas al uso de los regímenes divulgados según los métodos de la presente divulgación. El término "información profesional" incluye, pero no se limita a, información relativa al régimen cuando se administra según los métodos de la presente divulgación que está diseñada para permitir que un profesional médico responda las preguntas de los clientes. Un "profesional médico" incluye, por ejemplo, un médico, un auxiliar médico, un enfermero, un enfermero practicante, un farmacéutico y un representante de atención al paciente.

Habiendo descrito generalmente esta invención, se puede obtener una comprensión adicional mediante referencia a los ejemplos proporcionados en la presente. Estos ejemplos tienen solamente propósitos de ilustración y no pretenden ser limitativos.

Ejemplo 1

En este ejemplo, se cultivó *Schizochytrium* sp. en matraces de Erlenmeyer para agitación de 250 ml que contenían 50 ml de medio de cultivo. Se preparó un inóculo en el mismo medio que consistía en 0,625 g de NaCl, 1,0 g de KCl, 5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,29 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g de monohidrato de glutamato monosódico, 1,0 g de extracto de levadura y 23,8 g de tampón de HEPES disuelto en aproximadamente 900 ml de agua destilada. El medio se llevó hasta pH 7 usando NaOH. El volumen final del medio se llevó hasta 896 ml y el medio se esterilizó mediante tratamiento en autoclave. Después del tratamiento en autoclave, los siguientes componentes se añadieron estérilmente al medio: 0,89 ml de KH_2PO_4 en 56,5 g/l, 100 ml de glucosa en 500 g/l, 2 ml de solución madre de metales vestigiales y 1 ml de solución madre de vitaminas. La solución madre de metales vestigiales contenía lo siguiente: 90 g de ácido cítrico, 5,15 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,55 g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,965 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02 g de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,02 g de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,035 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1,035 g de $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ disueltos en un litro de agua destilada y se llevaron hasta pH 2,5 con HCl. La solución madre de vitaminas contenía lo siguiente: 0,16 g de vitamina B12, 9,75

g de tiamina, y 3,33 g de pantotenato cálcico disueltos en un litro de agua destilada. Los matraces para agitación se inocularon con 1 ml de inóculo. Se pusieron matraces por triplicado en una incubadora de CO₂ graduada para mantener una atmósfera de CO₂ bien al 5, bien al 10 o bien al 15% en aire. Otro grupo de matraces por triplicado se puso en una incubadora a niveles de CO₂ ambientales. Todos los grupos de matraces se agitaron a 200 rpm y todas las incubadoras se graduaron a 22,5°C. Después de siete días de desarrollo, la biomasa se recogió de los matraces para agitación mediante centrifugación, la biomasa se secó por congelación y el perfil de ácidos grasos de la biomasa se determinó usando procedimientos de esterificación metílica estándar. Los niveles elevados de CO₂ producían cambios significativos en la biomasa, el % de grasa y los perfiles de ácidos grasos. Era notable el cambio producido en los valores de % de EPA y % de DHA entre las condiciones de CO₂ y las condiciones ambientales. Por otra parte, los cambios en estos ácidos grasos se hacían más pronunciados a media que se incrementaba el nivel de CO₂. Los resultados se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4

MUESTRA	Biomasa (g/l)	% 16:0	% EPA	% DHA	% Grasa
Ambiente (1)	3,43	33,55	4,24	54,15	54,55
Ambiente (2)	3,35	33,29	4,30	54,42	52,67
Ambiente (3)	3,27	33,29	4,29	54,38	50,62
CO ₂ al 15% (1)	2,96	28,41	26,12	29,52	53,31
CO ₂ al 15% (2)	2,94	28,13	26,20	29,98	55,46
CO ₂ al 15% (3)	2,80	28,12	26,61	29,46	53,20
Ambiente (1)	3,89	35,34	3,95	52,31	60,21
Ambiente (2)	3,85	34,74	4,00	53,03	58,33
Ambiente (3)	3,91	34,76	4,04	52,95	58,18
CO ₂ al 10% (1)	4,91	33,35	12,94	41,13	69,98
CO ₂ al 10% (2)	5,03	33,28	12,99	41,15	69,58
CO ₂ al 10% (3)	4,95	33,46	12,84	41,02	69,08
Ambiente (1)	3,51	29,95	3,00	45,06	58,48
Ambiente (2)	3,69	30,57	2,97	44,92	54,87
Ambiente (3)	3,43	29,98	3,13	45,20	53,29
CO ₂ al 5% (1)	4,18	32,03	5,59	40,55	42,89
CO ₂ al 5% (2)	4,16	31,87	5,85	40,36	43,47
CO ₂ al 5% (3)	4,14	31,58	6,13	40,43	44,13

15 Ejemplo 2

En este ejemplo, se cultivó *Schizochytrium* sp. en matraces de Erlenmeyer para agitación de 250 ml que contenían 50 ml de medio de cultivo. Se preparó un inóculo en el mismo medio que consistía en 0,625 g de NaCl, 1,0 g de KCl, 5 g de MgSO₄·7H₂O, 0,1 g de (NH₄)₂SO₄, 0,29 g de CaCl₂·2H₂O, 1,0 g de monohidrato de glutamato monosódico, 1,0 g de extracto de levadura, y 23,8 g de tampón de HEPES disueltos en aproximadamente 900 ml de agua destilada. El medio se llevó hasta pH 7 usando NaOH. El volumen final del medio se llevó hasta 896 ml y el medio se esterilizó mediante tratamiento en autoclave. Después del tratamiento en autoclave, los siguientes componentes se añadieron estérilmente al medio: 0,89 ml de KH₂PO₄ en 56,5 g/l, 100 ml de glucosa en 500 g/l, 2 ml de solución madre de metales vestigiales y 1 ml de solución madre de vitaminas. La solución madre de metales vestigiales contenía lo siguiente: 90 g de ácido cítrico, 5,15 g de FeSO₄·7H₂O, 1,55 g de MnCl₂·4H₂O, 0,965 g de ZnSO₄·7H₂O, 0,02 g de CoCl₂·6H₂O, 0,02 g de Na₂MoO₄·2H₂O, 1,035 g de CuSO₄·5H₂O, 1,035 g de NiSO₄·6H₂O disueltos en un litro de agua destilada y el pH se llevó hasta 2,5 con HCl. La solución madre de vitaminas contenía lo siguiente: 0,16 g de vitamina B12, 9,75 g de tiamina y 3,33 g de pantotenato cálcico disueltos en un litro de agua destilada. Los matraces para agitación se inocularon con 1 ml de inóculo. Se pusieron matraces por duplicado en una incubadora de CO₂ graduada para mantener una atmósfera de CO₂ bien al 5, bien al 10 o bien al 15% en aire. Otro grupo de matraces por duplicado se puso en una incubadora a niveles de CO₂ ambientales. Todos los grupos de matraces se agitaron a 200 rpm y todas las incubadoras se graduaron a 22,5°C. Después de siete días de desarrollo, la biomasa se recogió de los matraces para agitación mediante centrifugación, la biomasa se secó por congelación y el perfil de ácidos grasos de la biomasa se determinó usando procedimientos de esterificación metílica estándar. Los niveles elevados de CO₂ producían

cambios significativos en la biomasa, el % de grasa y los perfiles de ácidos grasos. Era notable el cambio producido en los valores de % de EPA y % de DHA entre las condiciones de CO₂ y las condiciones ambientales. Por otra parte, los cambios en estos ácidos grasos se hacían más pronunciados a media que se incrementaba el nivel de CO₂. Los resultados se presentan en la Tabla 5 posterior.

5

Tabla 5

MUESTRA	Biomasa (g/l)	% 16:0	% EPA	% DHA	% Grasa
Ambiente (1)	5,81	28,22	3,88	58,69	60,86
Ambiente (2)	6,03	26,54	3,89	60,87	66,74
CO ₂ al 15% (1)	4,38	14,67	36,12	35,84	62,44
CO ₂ al 15% (2)	4,44	14,31	36,09	36,59	63,00
CO ₂ al 10% (1)	5,36	21,44	19,88	46,40	64,94
CO ₂ al 10% (2)	5,63	21,39	19,88	46,74	65,82
CO ₂ al 5% (1)	6,40	24,71	11,56	54,04	77,16
CO ₂ al 5% (2)	6,33	24,62	11,74	54,36	67,94

Ejemplo 3

En este ejemplo, se cultivó *Thraustochytrium* sp. en matraces de Erlenmeyer para agitación de 250 ml que contenían 50 ml de medio de cultivo. Se preparó un inóculo en el mismo medio que consistía en 42 g de Na₂SO₄, 0,625 g de NaCl, 1,0 g de KCl, 5 g de MgSO₄·7H₂O, 0,1 g de (NH₄)₂SO₄, 0,29 g de CaCl₂·2H₂O, 1,0 g de monohidrato de glutamato monosódico, 1,0 g de extracto de levadura y 23,8 g de tampón de HEPES disueltos en aproximadamente 900 ml de agua destilada. El medio se llevó hasta pH 7 usando NaOH. El volumen final del medio se llevó hasta 961 ml y el medio se esterilizó mediante tratamiento en autoclave. Después del tratamiento en autoclave, los siguientes componentes se añadieron estérilmente al medio: 0,89 ml de KH₂PO₄ en 56,5 g/l, 35 ml de glicerol en 500 g/l, 2 ml de solución madre de metales vestigiales y 1 ml de solución madre de vitaminas. La solución madre de metales vestigiales contenía lo siguiente: 9 g de ácido cítrico, 5,15 g de FeSO₄·7H₂O, 1,55 g de MnCl₂·4H₂O, 0,965 g de ZnSO₄·7H₂O, 0,02 g de CoCl₂·6H₂O, 0,02 g de Na₂MoO₄·2H₂O, 1,035 g de CuSO₄·5H₂O, 1,035 g de NiSO₄·6H₂O disueltos en un litro de agua destilada y el pH se llevó hasta 2,5 con HCl. La solución madre de vitaminas contenía lo siguiente: 0,16 g de vitamina B12, 9,75 g de tiamina y 3,33 g de pantotenato cálcico disueltos en un litro de agua destilada. Los matraces para agitación se inocularon con 1 ml de inóculo. Se pusieron matraces por triplicado en una incubadora de CO₂ graduada para mantener una atmósfera de CO₂ al 15% en aire. Otro grupo de matraces por triplicado se puso en una incubadora a niveles de CO₂ ambientales. Ambos grupos de matraces se agitaron a 200 rpm y ambas incubadoras se graduaron a 22,5°C. Después de siete días de desarrollo, la biomasa se recogió de los matraces para agitación mediante centrifugación, la biomasa se secó por congelación y el perfil de ácidos grasos de la biomasa se determinó usando procedimientos de esterificación metílica estándar. Una atmósfera de CO₂ al 15% en aire producía cambios sustanciales en el cultivo de *Thraustochytrium*. Con alto contenido de CO₂, la biomasa y el % de grasa eran inferiores que bajo condiciones ambientales. El % de 16:0 y el % de DHA eran inferiores y el % de EPA era significativamente superior que bajo condiciones ambientales. Los resultados se presentan en la Tabla 6 posterior.

30

Tabla 6

Atmósfera	Biomasa (g/l)	% 16:0	% EPA	% DHA	% Grasa
Ambiente (1)	3,39	31,74	11,61	44,65	53,32
Ambiente (2)	3,42	30,88	11,95	44,99	53,30
Ambiente (3)	3,39	32,13	11,46	44,19	53,93
CO ₂ al 15% (1)	2,23	22,12	36,94	19,04	38,73
CO ₂ al 15% (2)	2,05	21,40	37,14	18,57	39,34
CO ₂ al 15% (3)	2,11	21,68	36,83	18,52	40,86

Ejemplo 4

En este ejemplo [NBx0614et10], se cultivó especie *Schizochytrium* (ATCC PTA-10208) en cuatro fermentadores New Brunswick Scientific BioFlo 6000 de 100 litros como un volumen final buscado (receta) de 80 litros con un procedimiento discontinuo de alimentación de carbono (glucosa) y nitrógeno (hidróxido amónico) a diversas condiciones de sobrepresión para evaluar la sensibilidad del cultivo a un incremento de dióxido de carbono disuelto. Cada una de las fermentaciones se inoculó con 8 litros de cultivo. Para la propagación del inóculo, se utilizó un fermentador New Brunswick Scientific BioFlo 5000 de 80 litros. El medio del inóculo consistía en 65 litros de medio preparado en seis grupos separados. El grupo 1 consistía en 585 g de $\text{MSG} \cdot \text{H}_2\text{O}$, 65 g de KCl, 325 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 24,05 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 40,625 g de NaCl, 390 g de T154 (extracto de levadura) y 13 ml de Dow 1520US (antiespumante). El grupo 1 se esterilizó discontinuamente a 121 grados en el fermentador del inóculo en un volumen de aproximadamente 60 litros. El grupo 2 consistía en 18,85 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. El grupo 3 consistía en 33,8 g de KH_2PO_4 . Cada uno de los grupos 2 y 3 se trató en autoclave en soluciones separadas durante aproximadamente 45-60 minutos y se añadió al grupo 1 asépticamente después de la esterilización. El grupo 4 consistía en 201,5 mg de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 201,5 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,6 mg de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2,6 mg de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 134,6 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 134,6 mg de $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 669,4 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 1,522 g de ácido cítrico. El grupo 4 se trató en autoclave del mismo modo que los grupos 2 y 3. El grupo 5 consistía en 633,75 mg de tiamina-HCl, 10,4 mg de vitamina B12 y 216,5 mg de sal hemicálcica de ácido pantoténico. El grupo 5 se disolvió en agua RO y a continuación se esterilizó por filtración. El grupo 6 consistía en 3250 g de glucosa disueltos en un volumen de 3000 ml de agua RO. Después de que el fermentador del inóculo se enfriara hasta 22,5 grados Celsius, los grupos 2, 3, 4, 5 y 6 se añadieron al fermentador. Usando hidróxido sódico y ácido sulfúrico, el pH del fermentador se ajustó hasta 7 y el oxígeno disuelto se extendió hasta 100% antes de la inoculación. El fermentador del inóculo se inoculó con 1300 ml de un cultivo de fermentación menor (El cultivo de fermentación menor se preparó y se cultivó del mismo modo que el cultivo del inóculo de 65 litros) y se cultivó a 22,5 grados Celsius, pH 7, 180 rpm de agitación y 32,5 lpm de aire durante un período de 37 horas, en cuyo punto 8 litros de caldo de inóculo se transfirieron a cada fermentador de 100 litros. Cada fermentador de 100 litros contenía 80 litros de medio de fermentación. El medio de fermentación se preparó de un modo similar al fermentador del inóculo. Para cada fermentador de 100 litros, el medio de fermentación consistía en 6 grupos de medio por partidas. Para los recipientes NB5, NB6 y NB7, el grupo 1 contenía 704 g de Na_2SO_4 , 50 g de NaCl, 80 g de KCl, 400 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 33,6 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 80 g de extracto de levadura T154 y 8 ml de antisepumante Dow 1520-US. El grupo 1 se esterilizó al vapor a 122 grados Celsius durante 60 minutos en los fermentadores de 100 litros a un volumen de aproximadamente 35 litros. El grupo 2 contenía 23,2 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en un volumen de aproximadamente 300 ml. El grupo 3 contenía 141,2 g de KH_2PO_4 disueltos en agua RO. El grupo 4 contenía 248 mg de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 744 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3,2 mg de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 165,6 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 165,6 mg de $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 824 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 80 g de ácido cítrico todos disueltos en agua RO. El grupo 5 contenía 780 mg de tiamina-HCl, 266,4 mg de sal hemicálcica de ácido pantoténico y 286,4 ug de biotina, todos disueltos y esterilizados por filtración en agua RO. El grupo 6 contenía 2400 g de glucosa en aproximadamente 3 litros de agua RO. Los grupos 2, 3, 4, 5 y 6 se combinaron y se añadieron al fermentador después de que el fermentador alcanzara una temperatura de funcionamiento de 22,5 grados Celsius. Para el recipiente NB8, todos los grupos eran iguales que las otras tres condiciones con la excepción del ácido cítrico. En NB8, el grupo 4 solo contenía ~3,75 g de ácido cítrico. Cada volumen de fermentador antes de la inoculación era aproximadamente 52-53 litros. Cada fermentador se inoculó con 8 litros de caldo procedente de la fermentación del inóculo descrita anteriormente. El pH de la fermentación se controló utilizando una solución de 7,3 litros de hidróxido amónico 4 N a un pH de 7 hasta el agotamiento de nitrógeno, punto en el que se utilizaban hidróxido sódico 4 N y ácido sulfúrico 4 N para el control del pH. El oxígeno disuelto se controló para mantener un objetivo de 20% a lo largo de la fermentación usando agitación de 180 a 480 rpm y flujo de aire de 40 LPM a 80 LPM. Cada uno de estos recipientes se controló a una presión superior diferente [NB5=13789, NB6=103421 y NB7=137895 Pa (2, 15, 20 PSI)] para evaluar la sensibilidad del organismo al incremento de dióxido de carbono disuelto. A lo largo de la fermentación, se alimento una solución de 850 g/l de dextrosa (jarabe de maíz) al 95% para mantener una concentración de glucosa menor de 50 g/l. Después de 8 días, el peso celular seco y el título de omega-3 de cada fermentador de 80 litros era similar a NB5 con 110,1 g/l de DCW y 44,37 g/l de omega-3; NB6 con 117,7 g/l de DCW y 45,78 g/l de omega-3; NB7 con 114,1 g/l de DCW y 48,43 g/l de omega-3; NB8 con 119,5 g/l de DCW y 43,55 g/l de omega-3. A medida que se incrementaba la presión, el % de DHA/FAME disminuía, el % de EPA/FAME se incrementaba y la relación de DHA a EPA disminuía. Cuando se comparaba el contenido de ácidos grasos final de 13789 Pa (2 PSI) con 137895 Pa (20 PSI), el % de DHA/FAME disminuía de 50,48% a 41,26% y el % de EPA/FAME se incrementaba de 18,95% a 23,28%. Los resultados se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7

% EPA / FAME				
horas	NB5 [13789 Pa (2 PSI)]	NB6 [103421 Pa (15 PSI)]	NB7 [137895 Pa (20 PSI)]	NB8 [137895 Pa (20 PSI)]
17,5	12,63	13,43	13,15	14,32
41,5	12,05	12,01	11,54	16,37
65,5	14,03	16,54	15,34	20,37

ES 2 774 778 T3

% EPA / FAME				
horas	NB5 [13789 Pa (2 PSI)]	NB6 [103421 Pa (15 PSI)]	NB7 [137895 Pa (20 PSI)]	NB8 [137895 Pa (20 PSI)]
89,5	18,67	20,04	20,86	23,08
116,5	21,99	21,40	24,55	24,52
139,0	21,24	21,57	25,85	25,25
161,5	19,95	20,42	24,78	24,96
185,5	18,95	18,89	23,28	23,90

% DHA / FAME				
horas	NB5 [13789 Pa (2 PSI)]	NB6 [103421 Pa (15 PSI)]	NB7 [137895 Pa (20 PSI)]	NB8 [137895 Pa (20 PSI)]
17,5	48,66	52,94	52,56	49,15
41,5	52,62	52,38	52,98	43,43
65,5	45,69	41,45	44,05	35,17
89,5	40,35	39,22	34,81	31,87
116,5	42,26	39,77	34,14	32,42
139,0	45,70	41,83	34,92	33,31
161,5	48,55	44,96	38,09	35,65
185,5	50,48	47,52	41,26	38,38

Relación DHA:EPA				
horas	NB5 Pa [13789 (2 PSI)]	NB6 [103421 Pa (15 PSI)]	NB7 [137895 Pa (20 PSI)]	NB8 [137895 Pa (20 PSI)]
17,5	3,85	3,94	4,00	3,43
41,5	4,37	4,36	4,59	2,65
65,5	3,26	2,51	2,87	1,73
89,5	2,16	1,96	1,67	1,38
116,5	1,92	1,86	1,39	1,32
139,0	2,15	1,94	1,35	1,32
161,5	2,43	2,20	1,54	1,43
185,5	2,66	2,52	1,77	1,61

Ejemplo 5

- 5 En este ejemplo [Nx0719et10], se cultivó especie *Schizochytrium* (ATCC PTA-10208) en fermentadores New Brunswick Scientific BioFlo 310 de 14 litros a un volumen final buscado (receta) de 10 litros con un procedimiento discontinuo de alimentación de carbono (glucosa) y nitrógeno (hidróxido amónico). Tres de los cuatro fermentadores se complementaron con dióxido de carbono en momentos diferentes durante la fermentación para evaluar la sensibilidad del cultivo para incrementar el dióxido de carbono disuelto. NBS1, NBS2 y NBS3 se complementaron con dióxido de carbono empezando en log hora 12, 24 y 48, respectivamente. Cada una de las fermentaciones se inoculó con 1 litro de cultivo. Para la propagación del inóculo, se utilizó un fermentador Virtis de 14 litros. El medio del inóculo consistía en 10 litros de medio preparados en cuatro grupos separados. El grupo 1 consistía en 90 g de MSG*1H₂O, 10 g de KCl, 50 g de MgSO₄*7H₂O, 3,3 g de (NH₄)₂SO₄, 6,25 g de NaCl, 60 g de T154 (extracto de levadura), 4,97 g de KH₂PO₄, 2,9 g de CaCl₂*2H₂O y 2 ml de Dow 1520US (antiespumante). El grupo 2 consistía en 500 g de glucosa disueltos en un volumen de 800 ml de agua RO. El grupo 3 consistía en 31 mg de MnCl₂*4H₂O, 31 mg de ZnSO₄*7H₂O, 0,4 mg de CoCl₂*6H₂O, 0,4 mg de Na₂MoO₄*2H₂O, 20,7 mg de CuSO₄*5H₂O, 20,7 mg de NiSO₄*6H₂O, 103 mg de FeSO₄*7H₂O y 234,1 mg de ácido cítrico. Cada uno de los grupos 2 y 3 se trató en autoclave 60 minutos. El grupo 4 consistía en 97,5 mg de tiamina-HCl, 1,6 mg de vitamina B12 y 33,3 mg de sal hemicálcica de ácido pantoténico. El

grupo 4 se disolvió en agua RO y a continuación se esterilizó por filtración. Después de que el fermentador se enfriara hasta 22,5 grados Celsius, los grupos 2, 3, 4 y 5 se añadieron al fermentador. Usando hidróxido sódico y ácido sulfúrico, el pH del fermentador se ajustó hasta 7 y el oxígeno disuelto se extendió hasta 100% antes de la inoculación. El fermentador del inóculo se inoculó con 150 ml de un cultivo de fermentación menor (El cultivo de fermentación menor se preparó y se cultivó del mismo modo que el cultivo del inóculo de 10 litros) y se cultivó a 22,5 grados Celsius, pH 7, 433 rpm de agitación y 5 lpm de aire durante un período de 44,5 horas, punto en el cual 1 litro de caldo de inóculo se transfirió a cada fermentador de 14 litros. Cada fermentador de 14 litros contenía 10 litros de medio de fermentación. El medio de fermentación se preparó de un modo similar al fermentador del inóculo. Para cada fermentador de 14 litros, el medio de fermentación consistía en 6 grupos de medio por partidas. Para todos los recipientes, el grupo 1 contenía 60 g de Na_2SO_4 , 6,25 g de NaCl, 10 g de KCl, 50 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,43 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 g de Extracto de levadura T154 y 1 ml de antiespumante Dow 1520-US. El grupo 1 se trató en autoclave a 121 grados Celsius durante 120 minutos en los fermentadores de 14 litros en un volumen de aproximadamente 6,5 litros. El grupo 2 contenía 2,9 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en un volumen de aproximadamente 20 ml de agua RO. El grupo 3 contenía 17,61 g de KH_2PO_4 disueltos en 100 ml de agua RO. El grupo 4 contenía 31 mg de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 93 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,4 mg de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20,7 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 20,7 mg de $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 103 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 10 g de ácido cítrico todos disueltos en 50 ml de agua RO. El grupo 5 contenía 97,5 mg de tiamina-HCl, 33,3 mg de sal hemicálcica de ácido pantoténico y 36,3 ug de biotina, todos disueltos y esterilizados por filtración en 10 ml de agua RO. El grupo 6 contenía 300 g de glucosa en aproximadamente 0,5 litros de agua RO. Los grupos 2, 3, 4, 5 y 6 se combinaron y se añadieron al fermentador después de que el fermentador alcanzara una temperatura de funcionamiento de 22,5 grados Celsius. Cada volumen de fermentador antes de la inoculación era aproximadamente 6,5 litros. Cada fermentador se inoculó con 1 litro de caldo procedente de la fermentación del inóculo descrita anteriormente. El pH de la fermentación se controló utilizando 0,85 litros de solución de hidróxido amónico 4 N a un pH de 7 hasta el agotamiento de nitrógeno, punto en el cual se utilizaron hidróxido sódico 4 N y ácido sulfúrico 3 N para el control del pH a un punto fijo de 7,5. El oxígeno disuelto se controló para mantener un objetivo de 20% a lo largo de la fermentación usando agitación de 357 a 833 rpm y un flujo de aire de 7 LPM a 7 LPM. Cada uno de los recipientes NBS1, NBS2, NBS3 se complementó con dióxido de carbono durante diferentes espacios de tiempo para evaluar la sensibilidad del organismo al incremento del dióxido de carbono disuelto. A lo largo de la fermentación, se alimentaron 850 g/l de solución de dextrosa (jarabe de maíz) al 95% para mantener una concentración de glucosa menor de 50 g/l. Después de 8 días, el peso celular seco y el título de omega-3 de cada fermentador de 10 litros variaba dependiendo de las condiciones de complementación de dióxido de carbono. A las 183 horas, NBS1 estaba en 109,1 g/l de DCW y 45,87 g/l de omega-3; NBS2 estaba en 108,9 g/l de DCW y 45,41 g/l de omega-3; NBS3 estaba en 116,4 g/l de DCW y 50,6 g/l de omega-3; NBS4 estaba en 95,7 g/l de DCW y 40,36 g/l de omega-3. Poco después de que se iniciara la complementación con dióxido de carbono, el % de DHA/FAME disminuía, el % de EPA/FAME se incrementaba y la relación de DHA a EPA disminuía. Cuando se compara el contenido máximo de % de EPA/FAME de las condiciones complementadas con dióxido de carbono y la condición ambiental, había 65% de incremento en el contenido máximo de EPA bajo condiciones complementadas con CO_2 . Los resultados se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8

% EPA /FAME				
horas	NBS1 (+ CO_2 a las 12 horas)	NBS2 (+ CO_2 a las 24 horas)	NBS3 (+ CO_2 a las 48 horas)	NBS4 (sin CO_2 añadido)
15	12,29	10,67	10,22	10,14
39	22,82	19,32	10,37	9,85
63	23,79	24,58	19,77	15,09
87	23,69	23,71	23,83	14,09
114	27,85	27,55	26,91	16,98
137	29,47	27,94	26,76	17,81
159	29,13	27,20	26,52	17,81
183	27,62	25,50	25,62	17,09
% DHA /FAME				

ES 2 774 778 T3

horas	NBS1	NBS2	NBS3	NBS4
15	43,27	44,69	46,34	45,91
39	33,34	43,14	39,54	38,81
63	32,18	33,65	26,22	47,31
87	26,33	26,65	27,82	45,79
114	23,99	24,36	28,09	44,13
137	25,43	27,47	31,11	46,47
159	28,54	30,59	33,70	48,59
183	31,83	33,70	35,98	50,98

Relación DHA:EPA				
horas	NBS1	NBS2	NBS3	NBS4
15	3,52	4,19	4,53	4,53
39	1,46	2,23	3,81	3,94
63	1,35	1,37	1,83	3,14
87	1,11	1,12	1,17	3,25
114	0,86	0,88	1,04	2,60
137	0,86	0,98	1,16	2,61
159	0,98	1,12	1,27	2,73
183	1,15	1,32	1,40	2,98

dióxido de carbono complementado durante el espacio de tiempo destacado

Ejemplo 6

- 5 En este ejemplo [Nx0106et10], se cultivó la especie *Schizochytrium* (ATCC PTA-10208) en cuatro fermentadores New Brunswick Scientific BioFlo 310 de 14 litros como un volumen final buscado (receta) de 10 litros con un procedimiento discontinuo de alimentación de carbono (glucosa) y nitrógeno (hidróxido amónico). La temperatura se controló a lo largo de la prueba de fermentación para mantener un objetivo de 21,0°C, 22,5°C, 24,0°C y 25,5°C para NBS1, NBS2, NBS3 y NBS4, respectivamente. Cada una de las fermentaciones se inoculó con 1 litro de cultivo. Para la propagación del inóculo, se utilizó un fermentador Virtis de 14 litros. El medio del inóculo consistía en 10 litros de medio preparado en cuatro grupos separados. El grupo 1 consistía en 90 g de MSG*1H₂O, 10 g de KCl, 50 g de MgSO₄*7H₂O, 3,7 g de (NH₄)₂SO₄, 6,25 g de NaCl, 60 g de T154 (extracto de levadura), 5,2 g de KH₂PO₄, 2,9 g de CaCl₂*2H₂O y 2 ml de Dow 1520US (antiespumante). El grupo 1 se trató en autoclave a 121 grados durante 120 minutos en un volumen de aproximadamente 9,8 litros. El grupo 2 consistía en 500 g de glucosa disueltos en un volumen de 800 ml de agua RO. El grupo 3 consistía en 31 mg de MnCl₂*4H₂O, 31 mg de ZnSO₄*7H₂O, 0,4 mg de CoCl₂*6H₂O, 0,4 mg de Na₂MoO₄*2H₂O, 20,7 mg de CuSO₄*5H₂O, 20,7 mg de NiSO₄*6H₂O, 103 mg de FeSO₄*7H₂O y 234,1 mg de ácido cítrico. Cada uno de los grupos 2 y 3 se trató en autoclave durante 60 minutos. El grupo 4 consistía en 97,5 mg de tiamina-HCl, 1,6 mg de vitamina B12 y 33,3 mg de sal hemicálcica de ácido pantoténico. El grupo 4 se disolvió en

agua RO y a continuación se esterilizó por filtración. Después de que el fermentador se enfriara hasta 22,5 grados Celsius, los grupos 2, 3, 4, y 5 se añadieron al fermentador. Usando hidróxido sódico y ácido sulfúrico, el pH del fermentador se ajustó hasta 7 y el oxígeno disuelto se extendió hasta 100% antes de la inoculación. El fermentador del inóculo se inoculó con 200 ml de un cultivo de fermentación menor (El cultivo de fermentación menor se preparó y se cultivó del mismo modo que el cultivo del inóculo de 10 litros) y se cultivó a 22,5 grados Celsius, pH 7, 433 rpm de agitación y 5 lpm de aire durante un período de 42 horas, punto en el cual se transfería 1 litro de caldo de inóculo a cada fermentador de 14 litros. Cada fermentador de 14 litros contenía 10 litros de medio de fermentación. El medio de fermentación se preparó de un modo similar al fermentador del inóculo. Para cada fermentador de 14 litros, el medio de fermentación consistía en 4 grupos de medio por partidas. Para todos los recipientes, el grupo 1 contenía 88 g de Na_2SO_4 , 6,25 g de NaCl , 10 g de KCl , 50 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4,2 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,9 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 17,65 g de KH_2PO_4 , 10 g de extracto de levadura T154 y 1 ml de antiespumante Dow 1520-US. El grupo 1 se trató en autoclave a 121 grados Celsius durante 120 minutos en los fermentadores de 14 litros a un volumen de aproximadamente 7,0 litros. El grupo 2 contenía 31 mg de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 93 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,4 mg de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20,7 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 20,7 mg de $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 103 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 468 mg de ácido cítrico disueltos en 50 ml de agua RO. El grupo 2 se trató en autoclave durante 60 minutos. El grupo 3 contenía 97,5 mg de tiamina-HCl, 33,3 mg de sal hemicálcica de ácido pantoténico y 35,8 ug de biotina, todos disueltos y esterilizados por filtración en 10 ml de agua RO. El grupo 4 contenía 300 g de glucosa en aproximadamente 0,5 litros de agua RO y se trató en autoclave durante 60 minutos. Los grupos 2, 3 y 4 se combinaron y se añadieron al fermentador después de que el fermentador alcanzara una temperatura de funcionamiento de 22,5 grados Celsius. Cada volumen de fermentador antes de la inoculación era aproximadamente 6,5 litros. Cada fermentador se inoculó con 1 litro de caldo procedente de la fermentación del inóculo descrita anteriormente. El pH de la fermentación se controló a 7,0 a lo largo de la fermentación utilizando 0,85 litros de solución de hidróxido amónico 4 N hasta el agotamiento de nitrógeno, punto en el cual se utilizaron hidróxido sódico 4 N y ácido sulfúrico 3 N para el control del pH a un punto fijo. El oxígeno disuelto se controló para mantener un objetivo de 20% hasta el agotamiento del nitrógeno. Después del agotamiento del nitrógeno, el oxígeno disuelto se controló para mantener un objetivo de 10% hasta el final de la fermentación usando agitación de 357 a 714 rpm y 8 LPM de flujo de aire. A lo largo de la fermentación, se alimentaron 850 g/l de solución de dextrosa (jarabe de maíz) al 95% para mantener una concentración de glucosa menor de 50 g/l. Después de 8 días, el peso celular seco o el título de omega-3 variaban ligeramente para las diferentes temperaturas evaluadas; sin embargo, las temperaturas de fermentación inferiores daban como resultado un % de EPA/FAME superior. A las 184 horas, NBS1 estaba en 85,2 g/l de DCW y 29,9 g/l de omega-3; NBS2 estaba en 92,0 g/l de DCW y 35,0 g/l de omega-3; NBS3 estaba en 86,8 g/l de DCW y 31,7 g/l de omega-3; NBS4 estaba en 84,2 g/l de DCW y 29,4 g/l de omega-3.

Para NBS1, el % de EPA/FAME variaba de 12,36% a 19,02% de principio a fin de la prueba de fermentación con un máximo de 21,57%. Para NBS2, el % de EPA/FAME variaba de 11,72% a 18,11% de principio a fin de la prueba de fermentación con un máximo de 20,21%. NBS3, el % de EPA/FAME variaba de 11,49% a 15,43% de principio a fin de la prueba de fermentación con un máximo de 18,09%. NBS4, el % de EPA/FAME variaba de 11,65% a 13,65% de principio a fin de la prueba de fermentación con un máximo de 15,70%. Cuando se comparaba el % máximo de EPA/FAME, la temperatura de fermentación más baja daba como resultado un incremento de 37% en el contenido máximo de EPA sobre la temperatura de fermentación más alta evaluada. Los resultados se proporcionan en la Tabla 9 posteriormente.

Tabla 9

%EPA / FAME				
Horas	NBS1 (21 °C)	NBS2 (22,5 °C)	NBS3 (24 °C)	NBS4 (25,5 °C)
24	12,36	11,72	11,49	11,65
40	14,17	13,61	12,21	13,04
64	14,48	14,94	14,23	13,62
89	19,52	18,45	17,42	15,70
112	21,57	20,21	18,09	15,69
136	21,05	20,11	17,15	14,82
160	19,90	18,88	16,15	13,98
184	19,02	18,11	15,43	13,65

%DHA / FAME				
Horas	NBS1 (21 °C)	NBS2 (22,5 °C)	NBS3 (24 °C)	NBS4 (25,5 °C)
24	56,58	55,61	54,62	53,56
40	52,80	51,58	52,17	49,77

%DHA / FAME				
Horas	NBS1 (21 °C)	NBS2 (22,5 °C)	NBS3 (24 °C)	NBS4 (25,5 °C)
64	47,46	45,36	46,41	44,57
89	38,89	39,69	39,46	39,54
112	40,08	40,89	41,72	42,20
136	43,22	43,87	45,23	45,56
160	45,92	46,98	47,80	48,07
184	48,04	48,99	49,38	49,39

Relación DHA:EPA				
Horas	NBS1 (21 °C)	NBS2 (22,5 °C)	NBS3 (24 °C)	NBS4 (25,5 °C)
24	4,58	4,75	4,75	4,60
40	3,73	3,79	4,27	3,82
64	3,28	3,04	3,26	3,27
89	1,99	2,15	2,27	2,52
112	1,86	2,02	2,31	2,69
136	2,05	2,18	2,64	3,07
160	2,31	2,49	2,96	3,44
184	2,53	2,71	3,20	3,62

Ejemplo 7

- En este ejemplo [Nx0614et10], se cultivó la especie *Schizochytrium* (ATCC PTA-10208) en dos fermentadores New Brunswick Scientific BioFlo 310 de 14 litros en un volumen final buscado (receta) de 10 litros con un procedimiento discontinuo de alimentación de carbono (glucosa) y nitrógeno (hidróxido amónico). Un fermentador (NBS15) se roció con aire complementado con dióxido de carbono al 15% de principio a fin de la prueba de fermentación y el otro fermentador (NBS17) se roció solamente con aire para evaluar la sensibilidad del cultivo para incrementar el dióxido de carbono disuelto. Cada una de las fermentaciones se inoculó con 1 litro de cultivo. Para la propagación del inóculo, se utilizó un fermentador Virtis de 14 litros. El medio del inóculo consistía en 10 litros de medio preparado en cuatro grupos separados. El grupo 1 consistía en 90 g de MSG*1H₂O, 10 g de KCl, 50 g de MgSO₄*7H₂O, 3,3 g de (NH₄)₂SO₄, 6,25 g de NaCl, 60 g de T154 (extracto de levadura), 4,97 g de KH₂PO₄, 2,9 g de CaCl₂*2H₂O, y 2 ml Dow 1520US (antiespumante). El grupo 1 se trató en autoclave a 121 grados durante 120 minutos en un volumen de aproximadamente 9,8 litros. El grupo 2 consistía en 500 g de glucosa disueltos en un volumen de 800 ml de agua RO. El grupo 3 consistía en 31 mg de MnCl₂*4H₂O, 31 mg de ZnSO₄*7H₂O, 0,4 mg de CoCl₂*6H₂O, 0,4 mg de Na₂MoO₄*2H₂O, 20,7 mg de CuSO₄*5H₂O, 20,7 mg de NiSO₄*6H₂O, 103 mg de FeSO₄*7H₂O y 234,1 mg de ácido cítrico. Cada uno de los grupos 2 y 3 se trató en autoclave durante 60 minutos. El grupo 4 consistía en 97,5 mg de tiamina-HCl, 1,6 mg de vitamina B12 y 33,3 mg de sal hemicálcica de ácido pantoténico. El grupo 4 se disolvió en agua RO y a continuación se esterilizó por filtración. Después de que el fermentador se enfriara hasta 22,5 grados Celsius, los grupos 2, 3, 4 y 5 se añadieron al fermentador. Usando hidróxido sódico y ácido sulfúrico, el pH del fermentador se ajustó hasta 7 y el oxígeno disuelto se extendió hasta 100% antes de la inoculación. El fermentador del inóculo se inoculó con 200 ml de un cultivo de fermentación menor (El cultivo de fermentación menor se preparó y se cultivó del mismo modo que el cultivo del inóculo de 10 litros) y se cultivó a 22,5 grados Celsius, pH 7, 433 rpm de agitación y 5 lpm de aire durante un período de 40 horas, punto en el que 1 litro de inóculo se transfirió a cada fermentador de 14 litros. Cada fermentador de 14 litros contenía 10 litros de medio de fermentación. El medio de fermentación se preparó de un modo similar al fermentador del inóculo. Para cada fermentador de 14 litros, el medio de fermentación consistía en 6 grupos de medio por partidas. Para todos los recipientes, el grupo 1 contenía 88 g de Na₂SO₄, 6,25 g de NaCl, 10 g de KCl, 50 g de MgSO₄*7H₂O, 4,2 g de (NH₄)₂SO₄, 10 g de extracto de levadura T154 y 1 ml de antiespumante Dow 1520-US. El grupo 1 se trató en autoclave a 121 grados Celsius durante 120 minutos en los fermentadores de 14 litros en un volumen de aproximadamente 6,5 litros. El grupo 2 contenía 2,9 g de CaCl₂*2H₂O en un volumen de aproximadamente 20 ml de agua RO. El grupo 3 contenía 17,65 g de KH₂PO₄ disueltos en 100 ml de agua RO. El grupo 4 contenía 31 mg de MnCl₂*4H₂O, 93 mg de ZnSO₄*7H₂O, 0,4 mg de Na₂MoO₄*2H₂O, 20,7 mg de CuSO₄*5H₂O, 20,7 mg de NiSO₄*6H₂O, 103 mg de FeSO₄*7H₂O y 468 mg de ácido cítrico disueltos en 50 ml de agua RO. Cada uno de los grupos 2, 3 y 4 se trató en autoclave durante 60 minutos. El grupo 5 contenía 97,5 mg de tiamina-HCl, 33,3 mg de sal hemicálcica de ácido pantoténico y 36,3 ug de biotina, todos disueltos y esterilizados

por filtración en 10 ml agua RO. El grupo 6 contenía 300 g de glucosa en aproximadamente 0,5 litros de agua RO y se trató en autoclave durante 60 minutos. Los grupos 2, 3, 4, 5 y 6 se combinaron y se añadieron al fermentador después de que el fermentador alcanzara una temperatura de funcionamiento de 22,5 grados Celsius. Cada volumen de fermentador antes de la inoculación era aproximadamente 6,5 litros. Cada fermentador se inoculó con 1 litro de caldo procedente de la fermentación del inóculo descrita anteriormente. El pH de la fermentación se controló a 7,0 a lo largo de la fermentación utilizando 0,85 litros de una solución de hidróxido amónico 4 N hasta el agotamiento de nitrógeno, punto en el cual se utilizaron hidróxido sódico 4 N y ácido sulfúrico 3 N para el control del pH a un punto fijo. El oxígeno disuelto se controló para mantener un objetivo de 20% hasta el agotamiento del nitrógeno. Después del agotamiento del nitrógeno, el oxígeno disuelto se controló para mantener un objetivo de 10% hasta el final de la fermentación usando agitación de 357 a 833 rpm y 8 LPM de flujo de aire. A lo largo de la fermentación, se alimentaron 850 g/l de solución de dextrosa (jarabe de maíz) al 95% para mantener una concentración de glucosa menor de 50 g/l. Después de 8 días, el peso celular seco y el título de omega-3 de cada fermentador de 10 litros variaba dependiendo de las condiciones de complementación con dióxido de carbono. A las 188 horas, NBS15 estaba en 54,5 g/l de DCW y 13,7 g/l de omega-3; NBS17 estaba en 96,1 g/l de DCW y 37,5 g/l de omega-3. El % de EPA/FAME era mayor en NBS15 (condición complementada con CO₂ a lo largo de la prueba) que NBS17 (sin complementación con CO₂). Para NBS15, el % de EPA/FAME variaba de 25,50% a 35,48% de principio a fin de la prueba de fermentación con un máximo de 38,34%. Para NBS 17, el % de EPA/FAME variaba de 12,31% a 19,80% de principio a fin de la prueba de fermentación con un máximo de 22,29%. Cuando se comparaba el % máximo de contenido de EPA/FAME de las condiciones complementadas con dióxido de carbono y la condición ambiental, hay un 73% de incremento en el contenido máximo de EPA bajo condiciones complementadas con CO₂.

El % de DHA/FAME era menor para las condiciones complementadas con CO₂ que para la condición ambiental a lo largo de la prueba de fermentación. Los resultados se proporcionan en la Tabla 10 posteriormente.

Tabla 10

%EPA / FAME				
Horas	NBS1 (21 °C)	NBS2 (22,5 °C)	NBS3 (24 °C)	NBS4 (25,5 °C)
24	12,36	11,72	11,49	11,65
40	14,17	13,61	12,21	13,04
64	14,48	14,94	14,23	13,62
89	19,52	18,45	17,42	15,70
112	21,57	20,21	18,09	15,69
136	21,05	20,11	17,15	14,82
160	19,90	18,88	16,15	13,98
184	19,02	18,11	15,43	13,65

%DHA/FAME				
Horas	NBS1 (21 °C)	NBS2 (22,5 °C)	NBS3 (24 °C)	NBS4 (25,5 °C)
24	56,58	55,61	54,62	53,56
40	52,80	51,58	52,17	49,77
64	47,46	45,36	46,41	44,57
89	38,89	39,69	39,46	39,54
112	40,08	40,89	41,72	42,20
136	43,22	43,87	45,23	45,56
160	45,92	46,98	47,80	48,07
184	48,04	48,99	49,38	49,39

Relación DHA:EPA				
Horas	NBS1 (21 °C)	NBS2 (22,5 °C)	NBS3 (24 °C)	NBS4 (25,5 °C)
24	4,58	4,75	4,75	4,60
40	3,73	3,79	4,27	3,82

Relación DHA:EPA				
Horas	NBS1 (21 °C)	NBS2 (22,5 °C)	NBS3 (24 °C)	NBS4 (25,5 °C)
64	3,28	3,04	3,26	3,27
89	1,99	2,15	2,27	2,52
112	1,86	2,02	2,31	2,69
136	2,05	2,18	2,64	3,07
160	2,31	2,49	2,96	3,44
184	2,53	2,71	3,20	3,62

Ejemplo 8

En este ejemplo [K019], se cultivó la especie *Schizochytrium* (ATCC PTA-10208) en un fermentador agitado de 157.000 litros en un peso final buscado (receta) de 100.000 kg con un procedimiento discontinuo de alimentación de carbono (glucosa) y nitrógeno (amoníaco anhidro gaseoso). La fermentación se inoculó con 4500 kg de cultivo. Para la propagación del inóculo, se utilizó un fermentador de siembra agitado de 7500 litros. El medio del inóculo consistía en 4500 kg de medio preparado en cuatro grupos separados. El grupo 1 consistía en 40,5 kg de MSG*1H₂O, 4,5 kg de KCl, 22,5 kg de MgSO₄*7H₂O, 1,7 kg de (NH₄)₂SO₄, 2,81 kg de NaCl, 27 kg de T154 (extracto de levadura), 2 kg de KH₂PO₄, 985 g de CaCl₂ y 0,9 kg de Dow 1520US (antiespumante) disueltos en agua de procesamiento con un peso total de 2300 kg. El grupo 2 consistía en 247,5 kg de glucosa.1H₂O disueltos en agua de procesamiento con un peso total de 1500 kg. El grupo 1 se esterilizó en el fermentador de siembra y el grupo 2 se esterilizó en un recipiente separado, con vapor de agua in situ a 122-123 grados Celsius durante 30 minutos. El grupo 3 consistía en 14 g de MnCl₂*4H₂O, 14 g de ZnSO₄*7H₂O, 180 mg de CoCl₂*6H₂O, 180 mg de Na₂MoO₄*2H₂O, 9,3 g de CuSO₄*5H₂O, 9,3 g de NiSO₄*6H₂O, 46,4 g de FeSO₄*7H₂O y 105,3 g de ácido cítrico disueltos en 5 l de agua destilada. El grupo 3 se trató en autoclave a 121 grados Celsius durante 60 minutos. El grupo 4 consistía en 43,9 g de tiamina-HCl, 720 mg de vitamina B12 y 15 g de sales hemicálcicas de ácido pantoténico disueltos en 5 l de agua destilada y a continuación esterilizados por filtración. Después de que el fermentador de siembra se enfriara hasta 22,5 grados Celsius, los grupos 2, 3, 4 se añadieron al fermentador. Usando hidróxido sódico y ácido sulfúrico, el pH del fermentador se ajustó hasta 7 y el oxígeno disuelto se extendió hasta 100% antes de la inoculación. El fermentador de siembra se inoculó con 12 l de un cultivo de fermentación menor (El cultivo de fermentación menor se preparó y cultivó del mismo modo que el cultivo de siembra) y se cultivó a 22,5 grados Celsius, pH 7, 90 rpm de agitación y 130-170 Nm³/h de aire durante un período de 4-5 días para dar un peso celular seco de alrededor de 15 g/l. El medio de fermentación se preparó de un modo similar al fermentador del inóculo. El medio de fermentación consistía en 5 grupos. El grupo 1 contenía 177 kg de KH₂PO₄, 880 kg de Na₂SO₄, 500 kg de MgSO₄*7H₂O, 42 kg de (NH₄)₂SO₄, 100 kg de extracto de levadura T154 y 10 kg de antiespumante Dow 1520-US en una solución de 9.000 kg. El grupo 2 contenía 21,9 kg de CaCl₂, 62,5 kg de NaCl, 100 kg de KCl, en una solución de 9.000 kg. El grupo 1 y 2 se bombearon a través de un termointercambiador al fermentador, seguido por agua para dar 67.000 kg de peso en el fermentador. El grupo 3 contenía 310 g de MnCl₂*4H₂O, 930 g de ZnSO₄*7H₂O, 4 g de Na₂MoO₄*2H₂O, 207 g de CuSO₄*5H₂O, 207 g de NiSO₄*6H₂O, 1,03 kg de FeSO₄*7H₂O y 4,68 kg de ácido cítrico disueltos en 1500 kg de agua de procesamiento. El grupo 4 contenía 4300 kg de jarabe de maíz (DE-95, 70,5%). El grupo 3 y el grupo 4 se esterilizaron en diferentes recipientes, con vapor de agua in situ a 122-123 grados Celsius durante 30 minutos. El grupo 5 contenía 975 g de tiamina-HCl, 333 g de sal hemicálcica de ácido pantoténico y 358 mg de biotina, disueltos y esterilizados por filtración en 5 l de agua destilada. Los grupos 3, 4 y 5 se añadieron al fermentador después de que el fermentador se enfriara hasta 22,5 grados Celsius. El peso en el volumen del fermentador antes de la inoculación era aproximadamente 73.500 kg. Después de que se fijara la condición de fermentación inicial (temperatura: 22,5°C, presión: 0,34 bar, flujo de aire: 3000 Nm³/h, agitación, 40 rpm), el pH de fermentación se ajustó hasta 7 y el oxígeno disuelto se extendió hasta 100%. El peso después de la inoculación estaba alrededor de 78.000 kg. Al principio, el pH se controló a 7 utilizando amoníaco anhidro hasta que se añadían 550 kg de amoníaco, y a continuación se utilizó solución de hidróxido sódico al 30% para el control del pH en un punto fijo de 7,5. El oxígeno disuelto se controló para mantener un objetivo de 20% durante la alimentación de amoníaco y 10% posteriormente usando agitación de 40 a 100 rpm y flujo de aire de 2000 a 8000 Nm³/h. A lo largo de la fermentación, se alimentó una solución de jarabe de maíz DE-95 al 65% para mantener una concentración de glucosa de alrededor de 35 g/l. En otro ejemplo [K020], se realizaron cambios en el ejemplo K019: 1) la presión se redujo hasta 0,15 bar, 2) el peso después de la inoculación se redujo hasta 68.000 kg, 3) el flujo de aire se incrementó hasta por encima de 5000 Nm³/h a las 60 h después de la inoculación y se mantuvo alto a lo largo de la prueba independientemente de la concentración de oxígeno disuelto. Los tres cambios anteriores reducían la concentración de dióxido de carbono disuelto en el caldo. Los resultados mostraban que con el CO₂ reducido, el % de DHA/FAME se incrementaba de 38,38% a 43,8% y el % de EPA/FAME se reducía de 24,42% a 20,68%. La relación DHA:EPA se incrementaba de 1,57 a 2,12. Los resultados se presentan en la Tabla 11 posteriormente.

Tabla 11

K019			
Tiempo h	DHA/FAME %	EPA/FAME %	Relación DHA:EPA
38	56,32	11,47	4,91
50	51,03	13,2	3,87
62	43,99	16,97	2,59
74	34,65	19,94	1,74
86	32,14	22,56	1,42
98	30,05	25,2	1,19
134	31,45	28,36	1,11
146	33,54	27,43	1,22
158	35,48	26,29	1,35
170	37,16	25,47	1,46
182	38,38	24,42	1,57

Tabla 12

K020 (CO ₂ Disuelto Reducido)			
Envejecimiento h	DHA/FAME %	EPA/FAME %	Relación DHA:EPA
12	56,3	13,03	4,32
28	58,12	12	4,84
40	55,55	12,13	4,58
52	52,13	14,03	3,72
64	45,14	16,94	2,66
76	37,54	18,57	2,02
84	35,06	18,72	1,87
96	35,24	20,05	1,76
132	39,42	22,29	1,77
156	42,05	21,54	1,95
180	43,8	20,68	2,12

5

Ejemplo 9

En la tabla posterior, se calcula el CO₂ disuelto máximo para varios de los ejemplos usando la constante de Henry. La primera condición, "10 l (NBS4 0719et10) a 0 MPa (PSI) de contrapresión y 45,5 mmol/l/hora de CER", es el CO₂ disuelto calculado para NBS4 en la tabla 8 a una velocidad de desprendimiento de dióxido de carbono de 45,5 mmol/l/hora, un volumen de fermentación de 10 litros, una velocidad de aireación de 0,8 vvm y 0 MPa (PSI) de contrapresión. La segunda condición, "10 l de (NBS2 0719et10) a 0 MPa (PSI) de contrapresión con CO₂ al 6% en el gas de entrada y 50 mmol/l/hora de CER" es el CO₂ disuelto calculado para NBS2 en la Tabla 8 a una velocidad de desprendimiento de dióxido de carbono de 50 mmol/l/hora, un volumen de fermentación de 10 litros, una velocidad de aireación de 0,8 vvm, una contrapresión de 0 MPa (PSI) y con CO₂ complementado en la corriente de entrada al 6% del gas total según se mide mediante espectroscopía de masas usando un espectrómetro de masas Thermo Prima dB. La tercera condición, "80 litros de (NB5 0614et10) a 13789 Pa (2 PSI) de contrapresión y 55 mmol/l/hora CER", es el CO₂ disuelto calculado para NB5 en la Tabla 7 con una velocidad de desprendimiento de dióxido de carbono de 55 mmol/l/hora, un volumen de fermentación de 80 litros, una velocidad de aireación de 1,0 vvm y 13789 Pa (2 PSI) de contrapresión. La cuarta condición, "80 litros de (NB6 0614et10) a 103421 Pa (15 PSI) de contrapresión y 50 mmol/l/hora de CER", es el CO₂ disuelto calculado para NB6 en la Tabla 7 con una velocidad de desprendimiento de dióxido de carbono de 50 mmol/l/hora, un volumen de fermentación de 80 litros, una velocidad de aireación de 1,0 vvm y 103421 Pa (15 PSI) de contrapresión. La quinta condición, "80 litros de (NB7 & NB8 0614et10) a 137895 Pa

10

15

20

(20 PSI) de contrapresión y 50 mmol/l/hora de CER", es el CO₂ disuelto calculado para NB7 y NB8 en la Tabla 7 con una velocidad de desprendimiento de dióxido de carbono de 50 mmol/l/hora, un volumen de fermentación de 80 litros, una velocidad de aireación de 1,0 vvm y 137895 Pa (20 PSI) de contrapresión. Todos los valores de CER se calcularon usando datos de CO₂ de escape recogidos con un espectrómetro de masas Thermo Prima dB. Los resultados de los cálculos se proporcionan en las Tablas 13 y 14 posteriormente.

5

Tabla 13

10 l de (NBS4 0719et10) 0 MPa (PSI) de contrapresión y 45,5 mmol/l/hora de CER	RV	10	l
Presión Absoluta	entrada	1,01	bar
Flujo de aire	entrada	8	LPM
Vvm		0,8	
CO ₂ requerido en la entrada de aire	salida	0,14	%
Delta CO ₂ en el gas de escape		2,309125	%
CO ₂ en el gas de escape		2,446301	%
Presión parcial de CO ₂		0,024708	bar
	CO ₂ disuelto	0,000785	mol/l
	CO ₂ disuelto	34,53	ppm
10 l (NBS2 0719et10) a 0 MPa (PSI) de contrapresión con CO ₂ al 6% en el gas de entrada y 50 mmol/l/hora de CER	RV	10	l
Presión Absoluta	entrada	1,01	bar
Flujo de aire	entrada	8	LPM
Vvm		0,8	
CO ₂ requerido en la entrada de aire	salida	7,00	%
Delta CO ₂ en el gas de escape		2,5375	%
CO ₂ en el gas de escape		9,534653	%
Presión parcial de CO ₂		0,0963	bar
	CO ₂ disuelto	0,003059	mol/l
	CO ₂ disuelto	134,58	ppm
80 litros de (NB5 0614et10) a 13789 Pa (2 PSI) de contrapresión y 55 mmol/l/hora CER	RV	80	l
Contrapresión	entrada	0,138	bar
Presión Total		1,21	bar
Flujo de aire	entrada	80	LPM
Vvm		1	
Delta CO ₂	desde CPR	2,233	%
CO ₂ en la salida		2,233	%
Presión parcial de CO ₂		0,026975	bar
	CO ₂ disuelto	0,000857	mol/l
	CO ₂ disuelto	37,70	ppm
80 litros de (NB6 0614et10) a 103421 Pa (15 PSI) de contrapresión y 50 mmol/l/hora de CER	RV	80	l
Contrapresión	entrada	1,0345	bar
Presión Total		2,10	bar
Flujo de aire	entrada	80	LPM
Vvm		1	
Delta CO ₂	desde CPR	2,03	%
CO ₂ en la salida		2,03	%
Presión parcial de CO ₂		0,042721	bar
	CO ₂ disuelto	0,001357	mol/l
	CO ₂ disuelto	59,71	ppm
80 litros de (NB7 & N88 0614et10) a 137895 Pa (20 PSI) de contrapresión y 50 mmol/l/hora de CER	RV	80	l
Contrapresión	entrada	1,38	bar
Presión Total		2,45	bar
Flujo de aire	entrada	80	LPM
Vvm		1	
Delta CO ₂	desde CPR	2,03	%
CO ₂ en la salida		2,03	%
Presión parcial de CO ₂		0,049735	bar
	CO ₂ disuelto	0,00158	mol/l
	CO ₂ disuelto	69,51	ppm

Tabla 14

	NB5 [13789 Pa (2 PSI)]	NB6 [103421 Pa (15 PSI)]	NB7 [137895 (20 PSI)]	NB8 [137895 (20 PSI)]	NBS2 (+CO ₂ a las 24 horas)	NBS4 (sin CO ₂ añadido)
%EPA/FAME	21,99	21,57	25,85	25,25	27,94	17,81
%DHA/FAME	40,35	39,22	34,14	32,42	24,36	38,81
CO ₂ disuelto máximo	37,70	59,71	69,51	69,51	134,58	34,53

Ejemplo 10

- 5 Se realizaron experimentos para determinar el efecto de gradientes de vitaminas sobre el comportamiento (peso celular seco de biomasa (DW), % de DHA, % de grasa y % de EPA) usado el N° de Registro de la ATCC PTA-9695 en medio de matraz para agitación para *Thraustochytrium* (TSFM) bajo nivel de CO₂ ambiental.

- 10 **Materiales y Métodos:** Se usaron cuatro vitaminas (tiamina.HCl, B12, biotina y pantotenato Ca) en medio TSFM con 0,25 g/l de tasona y 0,625 g/l de NaCl (véase la Tabla 16). Se añadieron al medio MSG y KH₂PO₄ adicionales para mantener sus contenidos de nitrógeno y fósforo totales. Las concentraciones globales de vitaminas en el medio eran 0, 0,5x, 1x, 5x, 10x, 20x o 30x la cantidad estándar, dependiendo de las vitaminas estudiadas (véase la Tabla 17). El estudio en gradiente se realizó sobre cada vitamina separadamente. Sin embargo, en el caso de la biotina y el pantotenato Ca, también se incorporaron cantidades estándar de tiamina.HCl y B12 en el medio, puesto que las concentraciones de los dos últimos eran muy bajas en el TSFM normal. También se incluyeron en el experimento tres
- 15 controles de TSFM para comparación. Estos controles eran TSFM estándar con 2 g/l de tasona (véase la Tabla 15) y 1x tiamina.HCl y 1x B12 (C1); TSFM libre se tasona sin vitaminas (A); y TSFM libre de tasona con 1x tiamina.HCl y 1x B12 (B). Todos los controles contenían 0,625 g/l de NaCl. Se usó un cultivo de tres días de PTA-9695 para inocular matraces para agitación de 250 ml por duplicado con 0,1 g de DW/l. Todos los matraces (fondo plano con un total de 50 ml de medio) se incubaron aeróbicamente a 22,5±1 °C en un agitador giratorio (200 RPM). Todos los cultivos se
- 20 recogían después de 7 días, y se realizaba un análisis de FAME sobre las muestras de biomasa secadas por congelación finales

Tabla 15

Medio de Matraz para Agitación para *Thraustochytrium* (TSFM) con 2 g/l de tasona

Componente	Cantidad litro (g)	por [Solución madre] (g/l)	ml de solución madre a usar por litro	
NaCl	0,625	seco		
KCl	1	50	20 ml	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5	227	22 ml	
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,2	190	1,05 ml	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,29	seco		
Monohidrato MSG	de 2	seco		
Tasona 154	2	seco		
HEPES (100 mM) pH 7	23,8	seco		
KH ₂ PO ₄	0,1	56,5	1,77 ml	añádase después del tratamiento en autoclave
Glucosa	50	500	100 ml	añádase después del tratamiento en autoclave
Metales Vestigiales		véase posteriormente	1 ml	añádase después del tratamiento en autoclave
Vitaminas		véase posteriormente	1 ml	añádase después del tratamiento en autoclave
Solución de Metales Vestigiales				
FeCl ₃ ·6H ₂ O		2,9 mg	2,9	

CuSO ₄ .5H ₂ O	0,02 mg	0,02
MnCl ₂ .4H ₂ O	8,6 mg	8,6
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,26 mg	0,26
ZnCl ₂	0,6 mg	0,6
Ácido cítrico	12 mg	12 g (seco)
Solución de Vitaminas		
Tiamina	10 ug	10 mg/l
Vitamina B12	1 ug	1 mg/l

Tabla 16

5 **Medio de Matraz para Agitación para Thraustochytrium (TSFM) con 0,25 g/l de tasona**

Componente	Cantidad litro (g)	por [Solución (g/l)	madre]	ml de solución madre a usar por litro	
NaCl	0,625	seco			
KCl	1	50		20 ml	
MgSO ₄ .7H ₂ O	5	227		22 ml	
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,2	190		1,05 ml	
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,29	seco			
Monohidrato de MSG	4,554	seco			
Tasona GC 7189-1	0,25	seco			
HEPES (100 mM) pH 7	23,8	seco			
KH ₂ PO ₄	0,1	56,5		4,28 ml	añádase después del tratamiento en autoclave
Glucosa	50	500		100 ml	añádase después del tratamiento en autoclave
Metales Vestigiales		véase posteriormente		1 ml	añádase después del tratamiento en autoclave
Vitaminas		véase posteriormente		1 ml	añádase después del tratamiento en autoclave
Metales Vestigiales en TSFM Metal					
FeCl ₃ .6H ₂ O	2,9 mg	2,9			
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,02 mg	0,02			
MnCl ₂ .4H ₂ O	8,6 mg	8,6			
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,26 mg	0,26			
ZnCl ₂	0,6 mg	0,6			
Ácido cítrico	12 mg	12 g (seco)			
Solución de Vitaminas					
Tiamina	10 ug	10 mg/l			
Vitamina B12	1 ug	1 mg/l			

Tabla 17

Concentraciones de vitaminas usadas en este estudio (mg/l):

conc. vitaminas [X]	Tiamina.HCl	B12	Biotina	Pantotenato Ca
0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,5	0,005		0,00234	
1	0,010	0,001	0,00468	3,33
5	0,050	0,005		16,65
10	0,100	0,010	0,0468	33,30
20	0,200	0,020	0,0936	66,60
30			0,1404	

5 **Resultados:** El DW y el % de grasa más altos (6,7 g/l y 38,5%, respectivamente) para el gradiente de tiamina se alcanzaban cuando la cantidad de esta vitamina añadida al medio era 5 veces el nivel estándar (Figura 1). El % de DHA a este nivel de tiamina era 44,1%. Por debajo y por encima de 5x tiamina, tanto el DW como el % de grasa empezaban a disminuir. El % de DHA también disminuía en el medio con menos de 5x tiamina, y fluctuaba ligeramente por encima de 5x tiamina sin mejora significativa. El % de EPA en los cultivos con gradiente de tiamina variaba entre 8,6 y 11,5.

10 Cuando no se añadían tasona o vitaminas al medio (Figura 5, medio A), todo excepto el % de DHA disminuía significativamente. Sin embargo, el incremento en el % de DHA parecía ser artificial ya que tanto el DW como el % de grasa eran extremadamente bajos para esta condición. La concentración 1x B12 parecía ser óptima para el DW, el % de DHA, el % de grasa y el % de EPA (Figura 2). A este nivel de vitamina B12, se alcanzaba lo siguiente: 7,1 g/l de DW, 50,6% de DHA, 42,7% de grasa y 2,1% de EPA. El % de EPA más alto (11,5) se obtenía cuando no se añadía B12 al medio. El medio libre de tasona sin vitaminas añadida no mejoraba adicionalmente el comportamiento del organismo, y

15 el % de DHA superior parecía ser artificial, como se describió previamente (Figura 5, medio A).

De forma similar, la concentración 1x biotina era óptima para DW, el % de DHA y el % de grasa (Figura 3). Los valores correspondientes para estos parámetros eran: 6,8 g/l, 47,7% y 37,9%, respectivamente. El porcentaje de EPA en este punto era 1,9. El medio libre de tasona con 1x tiamina y 1x B12 (Figura 5, medio B) comprometía significativamente

20 el comportamiento global de PTA-9695.

El pantotenato Ca producía los DW, % de DHA y % de grasa más altos cuando esta vitamina se añadía al medio en 10x la cantidad estándar (Figura 4). Según esto, las concentraciones óptimas de estos parámetros eran 7,0 g/l, 47,3% y 39,1%. El contenido de EPA en todo el experimento de gradiente de pantotenato Ca era menor de 2%. Se apreciaba una reducción significativa en el comportamiento global de PTA-9695 cuando el organismo se desarrollaba en medio

25 libre de tasona con solamente 1x tiamina y 1x B12 (Figura 5, medio B).

Los resultados son como se muestra en las tablas de datos posteriores.

ID Trt →	1a	1b	2a	2b	3a	3b	4a	4b	5a	5b	6a	6b
Tiamina.H Cl [x]	0	0	0,5	0,5	1	1	5	5	10	10	20	20
B12 [x]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Biotina [x]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pantotenat o Ca [x]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
% DHA	39,3 1	38,49	40,43	44,2 7	45,32	43,95	41,49	46,6 1	42,87	48,90	44,1 4	42,2 9
% DHA promedio		38,90		42,3 5		44,63		44,0 5		45,89		43,2 1
% Grasa	32,3 1	31,47	32,40	37,6 2	37,25	32,74	34,92	42,0 3	36,85	39,11	36,6 3	36,2 7
% Grasa promedio		31,89		35,0 1		35,00		38,4 8		37,98		36,4 5

ES 2 774 778 T3

% EPA	11,48	11,61	10,38	9,11	8,94	8,28	10,28	8,06	10,45	6,88	8,73	10,03
% EPA promedio		11,54		9,74		8,61		9,17		8,57		9,38
% 16:0	29,58	29,48	31,34	31,19	30,38	31,87	30,15	31,04	30,20	30,97	31,59	30,00
% 16:0 promedio		29,53		31,26		31,13		30,59		30,58		30,80
% ARA	1,33	1,38	1,25	1,12	1,03	0,96	1,29	1,05	1,34	0,86	1,05	1,24
% ARA promedio		1,36		1,18		1,00		1,17		1,10		1,15
Conc. estándar de vitaminas		(g/l)										
Tiamina.HCl [1x]		1,00E-05										
B12 [1x]		1,00E-06										
Biotina [1x]		4,68E-06										
Pantotenato Ca [1x]		3,33E-03										
gradiente de vitaminas [x] →		0	0,5	1	5	10	20	30				
Tiamina.HCl [1x]		0	5,00E-06	1,00E-05	5,00E-05	1,00E-04	2,00E-04	3,00E-04				
B12 [1x]		0	5,00E-07	1,00E-06	5,00E-06	1,00E-05	2,00E-05	3,00E-05				
Biotina [1x]		0	2,34E-06	4,68E-06	2,34E-05	4,68E-05	9,36E-05	1,40E-04				
Pantotenato Ca [1x]		0	1,67E-03	3,33E-03	1,67E-02	3,33E-02	6,66E-02	9,99E-02				
Concentraciones de vitaminas totales incluyendo lo arrastrado del inóculo												
Tiamina.HCl (g/l)		2,38E-05	2,88E-05	3,38E-05	7,38E-05	1,24E-04	2,24E-04	3,24E-04				
B12 (g/l)		1,37E-08	5,14E-07	1,01E-06	5,01E-06	1,00E-05	2,00E-05	3,00E-05				
Biotina (g/l)		2,49E-04	2,51E-04	2,53E-04	2,72E-04	2,96E-04	3,42E-04	3,89E-04				
Pantotenato Ca (g/l)		3,10E-05	1,70E-03	3,36E-03	1,67E-02	3,33E-02	6,66E-02	9,99E-02				
Concentraciones de vitaminas totales (mg/ml) incluyendo lo arrastrado del inóculo												
Tiamina.HCl (g/l)		2,38E-02	2,88E-02	3,38E-02	7,38E-02	1,24E-01	2,24E-01	3,24E-01				
B12 (g/l)		1,37E-05	5,14E-04	1,01E-03	5,01E-03	1,00E-02	2,00E-02	3,00E-02				
Biotina (g/l)		2,49E-01	2,51E-01	2,53E-01	2,72E-01	2,96E-01	3,42E-01	3,89E-01				
Pantotenato Ca (g/l)		3,10E-02	1,70E+00	3,36E+00	1,67E+01	3,33E-01	6,66E-01	9,99E+01				

ES 2 774 778 T3

ID Trt →	7a	7b	8a	8b	9a	9b	10a	10b	11a	11b	12a	12b
Tiamina.HCl [x]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
B12 [x]	0	0	1	1	5	5	10	10	20	20	1	1
Biotina [x]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pantotenato Ca [x]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
% DHA	39,31	38,49	50,45	50,75	50,83	50,05	45,99	46,44	46,90	44,48	42,07	42,74
% DHA promedio		38,90		50,60		50,44		48,21		45,69		42,41
% Grasa	32,31	31,47	42,06	43,40	44,43	38,30	36,47	34,72	34,99	33,14	32,04	28,89
% Grasa promedio		31,89		42,73		41,36		35,59		34,06		30,46
% EPA	11,48	11,61	2,08	2,05	2,01	2,01	2,11	2,22	2,03	2,16	1,76	2,14
% EPA promedio		11,54		2,06		2,01		2,17		2,10		1,95
% 16:0	29,58	29,48	36,79	36,69	36,75	37,41	41,05	40,83	40,33	42,66	44,55	43,42
% 16:0 promedio		29,53		36,74		37,08		40,94		41,50		43,99
% ARA	1,33	1,38	0,16	0,15	0,17	0,14	0,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% ARA promedio		1,36		0,15		0,15		0,07		0,00		0,00

ID Trt →	13a	13b	14a	14b	15a	15b	16a	16b	17a	17b	18a	18b
Tiamina.HCl [x]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B12 [x]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Biotina [x]	0,5	0,5	1	1	10	10	20	20	30	30	0	0
Pantotenato Ca [x]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
% DHA	48,32	46,94	46,13	49,18	45,43	43,63	44,37	41,79	44,36	42,19	42,07	42,74
% DHA promedio		47,63		47,65		44,53		43,08		43,28		42,41
% Grasa	28,16	35,67	34,34	41,39	35,67	32,04	33,84	31,41	35,51	31,11	32,04	28,89

ES 2 774 778 T3

% Grasa promedio	31,92 37,87 33,85 32,63 33,31										30,46	
% EPA	2,38	1,83	1,92	1,91	1,81	1,77	1,82	1,84	1,94	1,88	1,76	2,14
% EPA promedio	39,26 39,42 42,46 43,46 43,28										1,95	
% 16:0	38,18	40,33	40,70	38,13	41,64	43,28	42,34	44,57	42,40	44,16	44,55	43,42
% 16:0 promedio	39,26 39,42 42,46 43,46 43,28										43,99	
% ARA	0,21	0,00	0,00	0,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
% ARA promedio	0,11 0,08 0,00 0,00 0,00										0,00	

ID Trt →	19a	19b	20a	20b	21a	21b	22a	22b	C1a (0,625 g/l NaCl)	C1b (0,625 g/l NaCl)
Tiamina.HCl [x]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B12 [x]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Biotina [x]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pantotenato Ca [x]	1	1	5	5	10	10	20	20	0	0
% DHA	45,05	41,26	44,94	46,70	50,66	43,87	44,23	38,53	56,95	56,92
% DHA promedio	43,16 45,82 47,27 41,38								56,93	
% Grasa	32,05	31,10	32,32	36,07	45,61	32,51	25,50	27,42	50,11	53,39
% Grasa promedio	31,57 34,20 39,06 26,46								51,75	
% EPA	1,94	1,73	1,86	1,83	1,87	1,82	2,21	1,73	2,50	2,45
% EPA promedio	1,83 1,84 1,85 1,97								2,47	
% 16:0	41,55	45,27	41,79	40,38	37,09	42,91	42,30	47,56	31,04	31,06
% 16:0 promedio	43,41 41,09 40,00 44,93								31,05	
% ARA	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20	0,21
% ARA promedio	0,00 0,00 0,08 0,00								0,20	

ES 2 774 778 T3

ID Trt →	Aa	Ab	Ba	Bb
Tiamina.HCl [x]	0	0	0	0
B12 [x]	0	0	0	0
Biotina [x]	0	0	0	0
Pantotenato Ca [x]	0	0	0	0
% DHA	51,82	56,09	50,74	54,23
% DHA promedio		53,96		52,48
% Grasa	9,02	7,13	20,86	26,54
% Grasa promedio		8,07		23,70
% EPA	5,91	6,63	3,71	3,38
% EPA promedio		6,27		3,54
% 16:0	25,07	20,69	34,01	31,44
% 16:0 promedio		22,88		32,72
% ARA	0,00	0,00	0,00	0,23
% ARA promedio		0,00		0,11

ID Trt →	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Tiamina.HCl [x]	0	0,5	1	5	10	20	0	0	0	0	0
B12 [x]	0	0	0	0	0	0	0	1	5	10	20
Biotina [x]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pantotenato Ca [x]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
% DHA promedio	38,90	42,35	44,63	44,05	45,89	43,21	38,90	50,60	50,44	46,21	45,69
% Grasa promedio	31,89	35,01	35,00	38,48	37,96	36,45	31,89	42,73	41,36	35,59	34,06
% EPA promedio	11,54	9,74	8,61	9,17	8,57	9,38	11,54	2,06	2,01	2,17	2,10
% 16:0 promedio	29,53	31,26	31,13	30,59	30,58	30,80	29,53	36,74	37,08	40,94	41,50
% ARA promedio	1,36	1,18	1,00	1,17	1,10	1,15	1,36	0,15	0,15	0,07	0,00

ID Trt →	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Tiamina/B12/Bio/Pant. Ca [x]	0/0/0/0	0,5/0/0/0	1/0/0/0	10/0/0/0	20/0/0/0	0/0/0/0	0/1/0/0	0/5/0/0	0/0/0/0	0/10/0/0	0/20/0/0
conc. vitaminas (g/l)	0/0/0/0	0,000005/0/0/0	0,00001/0/0/0	0,00005/0/0/0	0,0001/0/0/0	0,002/0/0/0	0/0/0/0	0/0,000001/0/0	0/0,000005/0/0	0/0,00001/0/0	0/0,00002/0/0
% DHA promedio	38,90	42,35	44,63	44,05	45,89	43,21	38,90	50,60	50,44	46,21	45,69
% Grasa promedio	31,89	35,01	35,00	38,48	37,96	36,45	31,89	42,73	41,36	35,59	34,06
% EPA promedio	11,54	9,74	8,61	9,17	8,57	9,38	11,54	2,06	2,01	2,17	2,10
% 16:0 promedio	29,53	31,26	31,13	30,59	30,58	30,80	29,53	36,74	37,08	40,94	41,50
% ARA promedio	1,36	1,18	1,00	1,17	1,10	1,15	1,36	0,15	0,15	0,07	0,00

conc. vitaminas totales (g/l)	2,38E-02	2,88E-02	3,38E-02	7,38E-02	1,24E-01	2,24E-01	1,37E-05	1,01E-03	5,01E-03	1,00E-02	2,00E-02
DW promedio (g/l)	5,863	6,214	6,112	6,658	6,365	6,277	5,863	7,079	7,001	6,505	6,442

ID Trt →	12	13	14	15	16
Tiamina.HCl [x]	1	1	1	1	1
B12 [x]	1	1	0	1	1
Biotina [x]	0	0,5	1	10	20
Pantotenato Ca [x]	0	0	0	0	0
% DHA promedio	42,41	47,63	47,65	44,53	43,08
% Grasa promedio	30,46	31,92	37,87	33,85	32,63
% EPA promedio	1,95	2,09	1,92	1,79	1,83
% 16:0 promedio	43,99	39,26	39,42	42,46	43,46
% ARA promedio	0,00	0,11	0,08	0,00	0,00

ID Trt →	12	13	14	15	16
Tiamina/B12/Bio/Pant. Ca [x]	1/1/0/0	1/1/0,5/0	1/1/1/0	1/1/10/0	1/1/20/0
conc. vitaminas (g/l)	0,00001/0,000001/0/0	0,00001/0,000001/0,00000234/0	0,00001/0,000001/0,00000468/0	0,00001/0,000001/0,0000468/0	0,00001/0,000001/0,0000936/0
% DHA promedio	42,41	47,63	47,65	44,53	43,08
% Grasa promedio	30,46	31,92	37,87	33,85	32,63
% EPA promedio	1,95	2,09	1,92	1,79	1,83
% 16:0 promedio	43,99	39,26	39,42	42,46	43,46
% ARA promedio	0,00	0,11	0,06	0,00	0,00

conc. vitaminas totales (g/l)	2,49E-01	2,51E-01	2,53E-01	2,96E-01	3,42E-01
DW promedio (g/l)	6,029	5,705	6,813	6,458	6,286

ID Trt →	17	18	19	20	21
Tiamina.HCl [x]	1	1	1	1	1
B12 [x]	1	1	1	1	1
Biotina [x]	30	0	0	0	0
Pantotenato Ca [x]	0	0	1	5	10
% DHA promedio	43,28	42,41	43,16	45,82	47,27
% Grasa promedio	33,31	30,46	31,57	34,20	39,06
% EPA promedio	1,91	1,95	1,83	1,84	1,85
% 16:0 promedio	43,28	43,99	43,41	41,09	40,00
% ARA promedio	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08

ID Trt →	17	18	19	20	21
Tiamina/B12/Bio/Pant. Ca [x]	1/1/30/0	1/1/0/0	1/1/0/1	1/1/0/5	1/1/0/10
conc. vitaminas (g/l)	0,00001/0,000001/0,0001404/0	0,00001/0,000001/0/0	0,00001/0,000001/0/0,00333	0,00001/0,000001/0/0,01665	0,00001/0,000001/0/0,0333
% DHA promedio	43,28	42,41	43,16	45,82	47,27
% Grasa promedio	33,31	30,46	31,57	34,20	39,06
% EPA promedio	1,91	1,95	1,83	1,84	1,85
% 16:0 promedio	43,28	43,99	43,41	41,09	40,00
% ARA promedio	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08

conc. vitaminas totales (g/l)	3,89E-01	3,10E-02	3,36E+00	1,67E+01	3,33E+01
DW promedio (g/l)	6,358	6,029	6,058	6,349	6,961

ID Trt →	22	C1 (0,625 g/l NaCl)	A	B
Tiamina.HCl [x]	1	1	0	1
B12 [x]	1	1	0	1
Biotina [x]	0	0	0	0
Pantotenato Ca [x]	20	0	0	0
% DHA promedio	41,38	56,93	53,96	52,48
% Grasa promedio	26,46	51,75	8,07	23,70
% EPA promedio	1,97	2,47	6,27	3,54
% 16:0 promedio	44,93	31,05	22,88	32,72
% ARA promedio	0,00	0,20	0,00	0,11

ID Trt →	22	C1	A	B
Tiamina/B12/Bio/Pant. Ca [x]	1/1/0/20	1/1/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0
conc. vitaminas (g/l)	0,00001/0,000001/0/0,0666	0,00001/0,000001/0/0	0/0/0/0	0,00001/0,000001/0/0
% DHA promedio	41,38	56,93	53,96	52,48
% Grasa promedio	26,46	51,75	8,07	23,70
% EPA promedio	1,97	2,47	6,27	3,54
% 16:0 promedio	44,93	31,05	22,88	32,72
% ARA promedio	0,00	0,20	0,00	0,11

conc. vitaminas totales (g/l)	6,66E+01			
DW promedio (g/l)	5,492	7,651	0,428	4,809

Ejemplo 11

Se realizaron experimentos para determinar el requerimiento mínimo de vitamina B12 del N° de Registro de la ATCC PTA-9695 para alcanzar un comportamiento máximo con CO₂ al 10%, incluyendo la cantidad mínima de vitamina B12 que se requiere para que un cultivo de PTA-9695 produzca un peso seco y un rendimiento de DHA máximos bajo condiciones de CO₂ al 10%.

Temperatura: 22,5 +/- 1C (con CO₂ al 10%)

Velocidad del agitador: 200 rpm

Medio de base: Medio para fermentador a escala reducida definido (DSDFM-B) (Tabla 20).

10 **Inóculo:** Cultivo de 3 días de PTA-9695 desarrollado en DSDFM-B con diferentes concentraciones de vitamina B12.

Un nuevo criovial de PTA-9695 se descongeló inicialmente en SDFM-B (Tabla 19), y posteriormente se desarrolló y se transfirió varias veces en SDFM-B definido bajo CO₂ al 10%. Se usó (al 4%) un cultivo de 3 días de PTA-9695 en DSDFM-B para preparar los matraces de inóculo inicial que contenían DSDFM-B con diversas concentraciones de vitamina B12 (es decir, de 7,68 mg/l a cero mg/l de B12 para los tratamientos A a I, según esto; véase la Tabla 18). Los matraces de inóculo para cada concentración de vitamina B12 se mantuvieron bajo CO₂ al 10% y al transferir los cultivos a sus medios recientes respectivos cada 7 días. La transferencia semanal de los cultivos era esencial para depurar cualquier exceso de vitamina B12 que se pudiera haber almacenado dentro de las células, de modo que se pudiera determinar más exactamente el requerimiento mínimo para esta vitamina. Matraces para agitación duplicados se inocularon con sus respectivos inóculos de 3 días a un DW teórico de 0,1 g/l, usando la densidad óptica a 600 nm.

Los cultivos se desarrollaron bajo CO₂ al 10% durante 9 días, antes de recogerse y analizarse adicionalmente mediante un ensayo de FAME.

Resultados:

Nota: Los puntos para la semana 3 se están ignorando en este estudio, ya que el suministro de CO₂ a la incubadora se había interrumpido, y los matraces se tenía que retirar de la incubadora a lo largo de 6 horas durante la renovación del laboratorio.

La exposición prolongada (hasta 4 semanas) de PTA-9695 a altas concentraciones de vitamina B12 (más de 3,84 mg/l) puede influir adversamente en el peso seco, el % de grasa y el rendimiento de DHA, mientras que una concentración de entre 1,5 y 768 ug/l de vitamina B12 no tiene un efecto significativo sobre el DW de PTA-9695, el % de grasa, el % de EPA y el rendimiento de DHA.

Se apreciaba un incremento en el número de células individuales (hasta 15, en oposición a 3-4) en cultivos que se habían desarrollado en presencia de 768 mg/l de vitamina B12 (tratamiento A).

Eliminar la vitamina B12 de la receta del medio incrementa significativamente el % de EPA en alrededor de 10%, mientras que disminuye ligeramente tanto el % de DHA como el % de 16:0. Las Figuras 6-19 y la Tabla 21 posteriores muestran los resultados de los experimentos.

Conclusión:

Un mínimo de alrededor de 1,5 ug/l de vitamina B12 (1/500^a de la concentración estándar en SDFM-B) es esencial para obtener DW, % de DHA, % de grasa y rendimiento de DHA máximos. Aunque las concentraciones muy altas de vitamina B12 (más de 3,84 mg/l) pueden reducir sustancialmente el DW, el % de grasa y el rendimiento de DHA, una privación completa de PTA-9695 de esta vitamina puede incrementar significativamente (aproximadamente 10%) su % de EPA. Niveles muy altos de vitamina B12 también pueden representar un papel en la promoción de la transformación del cultivo "grumoso" en "células individuales".

Tabla 18. Tratamientos con Vitamina B12

Tratamientos	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Vit. B12 (ug/l)	7680	3840	768	384	153,6	76,8	15,36	7,68	1,536	0

Tabla 19. Medio de Fermentador a Escala Reducida para PTA-9695 (SDFM-B), pH 7

Componente	MW	[Solución madre] (g/l)	ml de solución madre en matraz para agitación de 1 l	gramos de ingrediente seco en matraz para agitación de 1 l	Concentración final (g/l)
NaCl	58,44			0,625	0,625
KCl	74,56	56	17,9		1,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	246,5	227	22		5,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	132,14	190	0,525		0,1
CaCl ₂ ·2H ₂ O	147	60	4,833		0,290
MSG (p/ 1 mol de H ₂ O)	187,1			1,0	1,0
Na ₂ SO ₄	142,04			6,0	6,0
K ₂ SO ₄	174,27			1,0959	1,0959
Tastona (GC9156-1)				1,0	1,0
HEPES (100 mM) pH 7,0	195,2			23,8	23,8
KH ₂ PO ₄	136,07	56,5	0,885		0,05
Glucosa	180	500	100		50

Componente	MW	[Solución madre] (g/l)	ml de solución madre en matraz para agitación de 1 l	gramos de ingrediente seco en matraz para agitación de 1 l	Concentración final (g/l)
Mezcla de metales vestigiales					
FeSO ₄ ·7H ₂ O	278,02	1,03	10		0,0103
MnCl ₂ ·4H ₂ O	198	3,1	1		0,0031
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	287,4	9,3	1		0,0093
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	241,95	0,04	1		0,00004
CuSO ₄ ·5H ₂ O	249,5	2,07	1		0,00207
NiSO ₄ ·6H ₂ O	262,84	2,07	1		0,00207
Ácido cítrico (en FeSO ₄ ·7H ₂ O)		117,5			1,175
Solución de Vitaminas					
Vitamina B12	1355,4	0,768	1		0,000768
Tiamina.HCl	337,3	11,7	1		0,0117
Pantotenato Ca	476,54	3,996	1		0,003996
Biotina	244,3	0,002	2,17		0,00000434

Tabla 20. SDFM-B definido (DSDFM-B), pH 7

Componente	MW	[Solución madre] (g/l)	ml de solución madre en matraz para agitación de 1 l	gramos de ingrediente seco en matraz para agitación de 1 l	Concentración final (g/l)
NaCl	58,44			0,625	0,625
KCl	74,56	56	17,9		1,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	246,5	227	22		5,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	132,14	190	1,1483		0,218
CaCl ₂ ·2H ₂ O	147	60	4,833		0,290
MSG (p/ 1 mol de H ₂ O)	187,1			2,188	2,188
Na ₂ SO ₄	142,04			6,0	6,0
K ₂ SO ₄	174,27			1,1240	1,1240
Tastona (GC9156-1)				0,0	0,0
HEPES (100 mM) pH 7,0	195,2			23,8	23,8
KH ₂ PO ₄	136,07	56,5	2,475		0,140
Glucosa					
Mezcla de metales vestigiales	180	500	100		50
FeSO ₄ ·7H ₂ O					
MnCl ₂ ·4H ₂ O					
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	278,02	1,03	10		0,0103
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	198	3,1	1		0,0031

Componente	MW	[Solución madre] (g/l)	ml de solución madre en matraz para agitación de 1 l	gramos de ingrediente seco en matraz para agitación de 1 l	Concentración final (g/l)
CuSO ₄ .5H ₂ O	287,4	9,3	1		0,0093
NiSO ₄ .6H ₂ O	241,95	0,04	1		0,00004
Ácido cítrico (en FeSO ₄ .7H ₂ O)	249,5	2,07	1		0,00207
Solución de Vitaminas	262,84	2,07	1		0,00207
Vitamina B12		117,5			1,175
Tiamina.HCl					
Pantotenato Ca					
Biotina	1355,4	0,768	1		0,000768

Tabla 21. Datos de los Experimentos

Serie de matraces para agitación (SF)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ID Tratamiento	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Conc. Vit B12 (mg/l)	7680	3840	768	384	153,6	76,8	15,36	7,68	1,536	0
Conc. Vit B12 (Log 10 mg/l)	3,885361	3,584331	2,885361	2,584331	2,186391	1,885361	1,186391	0,885361	0,186391	0,001
DW (g/l)										
matraz 1	2,832	3,48	3,64	4,186	3,728	3,952	3,71	3,96	4,5	3,868
matraz 2	3,03	3,324	3,88	3,412	3,626	3,746	4,024	3,682	4,17	4,094
promedio	2,931	3,402	3,76	3,799	3,677	3,849	3,867	3,821	4,335	3,981
% Grasa (en % de superficie)										
matraz 1	56,9	55,5	58,9	63,9	61,6	60,5	60,4	64,7	66,6	60,4
matraz 2	52,4	56,7	61,6	59,8	58,7	60,7	64,1	57,9	66,3	62,9
promedio	54,6	56,1	60,3	61,9	60,1	60,6	62,2	61,3	66,5	61,7
% DHA										
matraz 1	45,4	45,8	46,6	48,2	45,3	46,4	47,9	47,4	48,9	46,4
matraz 2	45,7	44,0	47,1	46,4	46,3	46,0	48,8	46,6	48,0	46,5
promedio	45,5	44,9	46,9	47,3	45,8	46,2	48,4	47,0	48,4	46,5
DHA (mg/g)										
matraz 1	260,1	256,6	277,2	310,6	281,1	283,0	291,7	309,4	328,2	283,0
matraz 2	241,4	251,1	292,7	279,8	274,2	281,7	315,4	271,9	320,9	294,9
promedio	250,8	253,9	285,0	295,2	277,7	282,3	303,5	290,6	324,6	289,0
% Grasa (en mg/g)										
matraz 1	57,3	56,0	59,4	64,4	62,1	61,0	60,9	65,2	67,1	60,9
matraz 2	52,8	57,1	62,1	60,3	59,2	64,2	64,6	58,4	66,9	63,4
promedio	55,1	56,5	60,8	62,4	60,6	61,1	62,7	61,8	67,0	62,2
Grasa (g/l)										
matraz 1	1,6	1,9	2,2	2,7	2,3	2,4	2,3	2,6	3,0	2,4
matraz 2	1,6	1,9	2,4	2,1	2,1	2,3	2,6	2,1	2,8	2,6
promedio	1,6	1,9	2,3	2,4	2,2	2,4	2,4	2,4	2,9	2,5
Rendimiento DHA (g/l)										

ES 2 774 778 T3

matraz 1	0,7	0,9	1,0	1,3	1,0	1,1	1,1	1,2	1,5	1,1
matraz 2	0,7	0,8	1,1	1,0	1,0	1,1	1,3	1,0	1,3	1,2
promedio	0,7	0,9	1,1	1,1	1,0	1,1	1,2	1,1	1,4	1,2
% EPA										
matraz 1	19,2	20,1	18,7	16,7	20,4	19,0	16,1	17,5	15,5	19,3
matraz 2	18,6	21,6	18,2	18,3	19,0	19,5	15,2	18,9	16,7	19,2
promedio	18,9	20,8	18,5	17,5	19,7	19,2	15,6	18,2	16,1	19,3
EPA (mg/g)										
matraz 1	108,2	110,3	109,2	105,8	124,7	113,6	96,1	112,2	102,5	115,5
matraz 2	96,3	121,4	111,1	108,4	110,6	117,3	96,3	108,1	110,0	120,0
promedio	102,3	115,8	110,2	107,1	117,7	115,5	96,2	110,1	106,3	117,7
Rendimiento EPA										
matraz 1	0,3	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	0,4	0,5	0,5	0,5
matraz 2	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5
promedio	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,4	0,4	0,5	0,5
L-F DW (g/l)										
matraz 1	1,2	1,5	1,5	1,5	1,4	1,5	1,5	1,4	1,5	1,5
matraz 2	1,4	1,4	1,5	1,4	1,5	1,5	1,4	1,5	1,4	1,5
promedio	1,3	1,5	1,5	1,4	1,4	1,5	1,4	1,5	1,4	1,5
% 16:0										
matraz 1	24,0	22,8	23,1	23,6	22,6	23,0	24,4	23,4	23,9	22,5
matraz 2	24,2	22,7	23,1	23,8	23,1	22,8	24,5	23,0	23,6	22,5
promedio	24,1	22,7	23,1	23,7	22,9	22,9	24,4	23,2	23,7	22,5
% DPA n-3										
matraz 1	1,1	1,0	1,2	1,0	1,2	1,1	1,1	1,1	1,0	1,1
matraz 2	1,1	1,1	1,1	1,2	1,1	1,2	1,1	1,1	1,0	1,1
promedio	1,1	1,1	1,1	1,1	1,2	1,2	1,1	1,1	1,0	1,1
% DPA n-6										
matraz 1	2,1	2,1	2,3	2,5	2,1	2,2	2,4	2,4	2,6	2,2
matraz 2	2,2	2,0	2,3	2,2	2,2	2,2	2,5	2,2	2,5	2,2
promedio	2,1	2,0	2,3	2,3	2,2	2,2	2,5	2,3	2,5	2,2
% Omega-3 totales										
matraz 1	65,7	66,9	66,5	66,0	66,9	66,5	65,1	66,0	65,4	66,9
matraz 2	65,4	66,7	66,5	65,9	66,5	66,7	65,1	66,5	65,8	66,9
promedio	65,6	66,8	66,5	65,9	66,7	66,6	65,1	66,3	65,6	66,9
pH										
matraz 1	6,81	6,83	6,84	6,83	6,82	6,82	6,83	6,83	6,82	6,81
matraz 2	6,81	6,83	6,81	6,82	6,83	6,82	6,82	6,82	6,82	6,81
promedio	6,81	6,83	6,83	6,83	6,83	6,82	6,83	6,83	6,82	6,81

Tabla 21. Continuación

Serie de matraces para agitación (SF)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
ID Tratamiento	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Conc. Vit B12 (mg/l)	7680	3840	768	384	153,6	76,8	15,36	7,68	1,536	0
Conc. Vit B12 (Log 10 mg/l)	3,885361	3,584331	2,885361	2,584331	2,186391	1,885361	1,186391	0,885361	0,186391	0,001
DW (g/l)										
matraz 1	2,01	4,17	4,176	3,764	4,276	4,218	3,916	4,44	4,59	3,676

ES 2 774 778 T3

matraz 2	2,574	3,354	4,106	3,824	3,922	4,21	4,046	4,352	4,518	3,174
promedio	2,292	3,762	4,141	3,794	4,099	4,214	3,981	4,396	4,554	3,425
% Grasa (en % de superficie)										
matraz 1	28,8	62,2	64,4	60,5	65,3	58,8	58,2	66,4	63,0	61,4
matraz 2	39,2	55,6	65,0	55,9	62,6	62,2	65,4	62,0	66,3	53,0
promedio	34,0	58,9	64,7	58,2	63,9	60,5	61,8	64,2	64,7	57,2
% DHA										
matraz 1	38,9	46,4	47,5	46,1	48,0	45,7	43,2	47,7	47,9	38,5
matraz 2	40,9	41,3	46,9	43,6	46,3	47,1	45,2	47,6	47,5	35,3
promedio	39,9	43,9	47,2	44,9	47,1	46,4	44,2	47,6	47,7	36,9
DHA (mg/g)	109,7	283,1	300,1	273,9	307,2	263,4	246,7	310,6	296,0	232,1
matraz 1	157,3	225,4	299,0	239,5	284,4	287,8	290,3	289,4	309,4	183,6
matraz 2	133,5	254,3	299,6	256,7	295,8	275,6	268,5	300,0	302,7	207,8
promedio	28,8	62,2	64,4	60,5	65,3	58,8	58,2	66,4	63,0	61,4
% Grasa (en mg/g)										
matraz 1	28,2	61,0	63,1	59,4	64,0	57,7	57,1	65,1	61,9	60,2
matraz 2	38,5	54,5	63,7	54,9	61,4	61,1	64,2	60,8	65,1	52,0
promedio	33,3	57,8	63,4	57,2	62,7	59,4	60,6	63,0	63,5	56,1
Grasa (g/l)										
matraz 1	0,6	2,5	2,6	2,2	2,7	2,4	2,2	2,9	2,8	2,2
matraz 2	1,0	1,8	2,6	2,1	2,4	2,6	2,6	2,6	2,9	1,7
promedio	0,8	2,2	2,6	2,2	2,6	2,5	2,4	2,8	2,9	1,9
Rendimiento DHA (g/l)										
matraz 1	0,2	1,2	1,3	1,0	1,3	1,1	1,0	1,4	1,4	0,9
matraz 2	0,4	0,8	1,2	0,9	1,1	1,2	1,2	1,3	1,4	0,6
promedio	0,3	1,0	1,2	1,0	1,2	1,2	1,1	1,3	1,4	0,7
% EPA										
matraz 1	22,9	19,0	18,8	17,4	17,1	18,8	21,6	18,0	16,4	28,3
matraz 2	20,8	24,5	18,8	19,6	18,8	17,0	20,0	16,1	16,8	31,4
promedio	21,8	21,8	18,8	18,5	17,9	17,9	20,8	17,0	16,6	29,8
EPA (mg/g)										
matraz 1	63,9	114,9	117,4	102,4	108,3	107,6	122,1	115,8	100,5	168,9
matraz 2	79,1	132,4	118,6	106,6	114,4	102,8	127,0	96,9	108,3	161,6
promedio	71,5	123,6	118,0	104,5	111,4	105,2	124,5	106,4	104,4	165,2
Rendimiento EPA										
matraz 1	0,1	0,5	0,5	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6
matraz 2	0,2	0,4	0,5	0,4	0,5	0,4	0,5	0,4	0,5	0,5
promedio	0,2	0,5	0,5	0,4	0,5	0,4	0,5	0,5	0,5	0,6
L-F DW (g/l)										
matraz 1	1,4	1,6	1,5	1,5	1,5	1,8	1,7	1,5	1,8	1,5
matraz 2	1,6	1,5	1,5	1,7	1,5	1,6	1,5	1,7	1,6	1,5
promedio	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,7	1,6	1,6	1,7	1,5
% 16:0										
matraz 1	26,0	22,5	21,7	24,3	22,5	23,1	23,0	22,0	23,2	20,2
matraz 2	25,9	22,1	21,9	24,2	22,6	23,3	22,5	23,5	23,1	19,9
promedio	26,0	22,3	21,8	24,3	22,5	23,2	22,7	22,8	23,2	20,0
% DPA n-3										

ES 2 774 778 T3

matraz 1	1,5	1,0	1,1	1,0	1,0	1,0	1,0	0,9	1,0	1,4
matraz 2	1,2	1,1	1,0	1,0	1,0	1,0	0,9	1,0	0,9	1,4
promedio	1,4	1,0	1,1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,9	1,4
% DPA n-6										
matraz 1	1,3	2,3	2,3	2,3	2,5	2,3	1,9	2,4	2,6	1,3
matraz 2	1,7	1,6	2,3	2,1	2,3	2,5	2,1	2,6	2,5	1,1
promedio	1,5	1,9	2,3	2,2	2,4	2,4	2,0	2,5	2,6	1,2
% Omega-3 totales										
matraz 1	63,2	66,4	67,4	64,5	66,1	65,5	65,8	66,6	65,2	68,2
matraz 2	62,9	66,9	66,7	64,2	66,1	65,1	66,1	64,6	65,2	68,1
promedio	63,1	66,7	67,0	64,4	66,1	65,3	66,0	65,6	65,2	68,1
pH										
matraz 1	6,70	6,69	6,72	6,71	6,71	6,72	6,71	6,71	6,72	6,71
matraz 2	6,67	6,71	6,72	6,71	6,72	6,72	6,71	6,71	6,72	6,71
promedio	6,69	6,70	6,72	6,71	6,72	6,72	6,71	6,71	6,72	6,71

Tabla 21. Continuación

Serie de matraces para agitación (SF)	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
ID Tratamiento	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Conc. Vit B12 (mg/l)	7680	3840	768	384	153,6	76,8	15,36	7,68	1,536	0
Conc. Vit B12 (Log 10 mg/l)	3,885361	3,584331	2,885361	2,584331	2,186391	1,885361	1,186391	0,885361	0,186391	0,001
DW (g/l)										
matraz 1	2,786	2,92	4,108	3,258	3,524	4,258	3,974	3,794	3,74	3,902
matraz 2	2,868	3,106	2,87	3,376	3,234	4,39	4,834	3,374	4,434	3,82
promedio	2,827	3,013	3,489	3,317	3,379	4,324	4,404	3,584	4,087	3,861
% Grasa (en % de superficie)										
matraz 1	42,6	41,0	54,5	46,5	50,7	59,8	57,0	51,0	55,9	62,3
matraz 2	44,0	43,1	48,4	49,8	49,3	56,8	62,2	52,3	56,4	56,5
promedio	43,3	42,0	51,4	48,1	50,0	58,3	59,6	51,7	56,2	59,4
% DHA										
matraz 1	42,0	39,8	43,0	43,1	43,1	44,8	54,4	44,0	43,4	45,4
matraz 2	41,9	39,9	40,5	42,8	42,5	44,2	46,3	43,8	37,7	38,3
promedio	41,9	39,9	41,8	42,9	42,8	44,5	45,9	43,9	40,6	41,9
DHA (mg/g)										
matraz 1	177,2	161,7	232,4	198,4	216,2	265,6	256,5	222,5	240,8	280,2
matraz 2	182,6	170,3	194,2	210,9	207,6	248,8	285,6	227,2	211,0	214,4
promedio	179,9	166,0	213,3	204,6	211,9	257,2	271,1	224,8	225,9	247,3
% Grasa (en mg/g)										
matraz 1	42,2	40,6	54,0	46,1	50,2	59,2	56,4	50,5	55,4	61,7
matraz 2	43,6	42,7	47,9	49,3	48,9	56,3	61,7	51,9	55,9	56,0
promedio	42,9	41,7	51,0	47,7	49,5	57,8	59,1	51,2	55,7	58,8
Grasa (g/l)										
matraz 1	1,2	1,2	2,2	1,5	1,8	2,5	2,2	1,9	2,1	2,4
matraz 2	1,2	1,3	1,4	1,7	1,6	2,5	3,0	1,7	2,5	2,1
promedio	1,2	1,3	1,8	1,6	1,7	2,5	2,6	1,8	2,3	2,3

Rendimiento DHA (g/l)										
matraz 1	0,5	0,5	1,0	0,6	0,8	1,1	1,0	0,8	0,9	1,1
matraz 2	0,5	0,5	0,6	0,7	0,7	1,1	1,4	0,8	0,9	0,8
promedio	0,5	0,5	0,8	0,7	0,7	1,1	1,2	0,8	0,9	1,0
% EPA										
matraz 1	22,4	24,7	23,9	22,0	23,5	22,1	20,9	22,3	23,8	21,3
matraz 2	23,0	24,9	25,7	22,8	24,4	23,0	20,1	22,6	31,3	30,9
promedio	22,7	24,8	24,8	22,4	24,0	22,6	20,5	22,4	27,5	26,1
EPA (mg/g)										
matraz 1	93,6	99,2	127,3	100,4	116,5	129,6	116,7	111,3	130,2	129,9
matraz 2	98,9	105,2	121,5	111,2	118,0	128,1	122,6	115,5	173,1	170,7
promedio	96,2	102,2	124,4	105,8	117,2	128,8	119,7	113,4	151,6	150,3
Rendimiento EPA										
matraz 1	0,3	0,3	0,5	0,3	0,4	0,6	0,5	0,4	0,5	0,5
matraz 2	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,6	0,6	0,4	0,8	0,7
promedio	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,6	0,5	0,4	0,6	0,6
L-F DW (g/l)										
matraz 1	1,6	1,7	1,9	1,8	1,8	1,7	1,7	1,9	1,7	1,5
matraz 2	1,6	1,8	1,5	1,7	1,7	1,9	1,9	1,6	2,0	1,7
promedio	1,6	1,8	1,7	1,7	1,7	1,8	1,8	1,8	1,8	1,6
% 16:0										
matraz 1	24,0	23,8	21,4	23,1	21,7	21,3	21,9	22,0	21,0	21,6
matraz 2	23,5	23,5	21,7	22,8	21,4	21,0	21,5	22,0	18,2	18,0
promedio	23,7	23,6	21,5	23,0	21,6	21,1	21,7	22,0	19,6	19,8
% DPA n-3										
matraz 1	1,2	1,2	1,0	1,2	1,2	1,0	1,0	1,1	1,0	0,9
matraz 2	1,2	1,2	1,1	1,2	1,2	1,0	1,0	1,1	1,3	1,4
promedio	1,2	1,2	1,1	1,2	1,2	1,0	1,0	1,1	1,2	1,1
% DPA n-6										
matraz 1	1,7	1,4	1,8	1,8	1,8	2,0	2,1	1,9	1,8	2,1
matraz 2	1,7	1,5	1,5	1,8	1,7	2,0	2,3	1,9	1,2	1,3
promedio	1,7	1,5	1,7	1,8	1,8	2,0	2,2	1,9	1,5	1,7
% Omega-3 totales										
matraz 1	65,6	65,8	67,9	66,3	67,7	67,9	67,4	67,4	68,2	67,6
matraz 2	66,0	66,0	67,3	66,8	68,1	68,3	67,4	67,5	70,4	70,5
promedio	65,8	65,9	67,6	66,6	67,9	68,1	67,4	67,5	69,3	69,1
pH										
matraz 1	6,85	6,89	6,89	6,88	6,88	6,88	6,87	6,88	6,88	6,87
matraz 2	6,86	6,89	6,89	6,88	6,88	6,89	6,86	6,87	6,88	6,86
promedio	6,86	6,89	6,89	6,88	6,88	6,89	6,87	6,88	6,88	6,87

Tabla 21. Continuación

Serie de matraces para agitación (SF)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
ID Tratamiento	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Conc. Vit B12 (mg/l)	7680	3840	768	384	153,6	76,8	15,36	7,68	1,536	0
Conc. Vit B12 (Log 10 mg/l)	3,885361	3,584331	2,885361	2,584331	2,186391	1,885361	1,186391	0,885361	0,186391	0,001
DW (g/l)										

ES 2 774 778 T3

matraz 1	2,538	2,512	4,242	4,528	2,498	3,796	3,79	3,87	3,676	3,972
matraz 2	2,646	3,162	2,86	4,368	2,744	3,774	3,81	4,002	4,202	4,35
promedio	2,592	2,837	3,551	4,448	2,621	3,785	3,8	3,936	3,939	4,161
% Grasa (en % de superficie)										
matraz 1	42,5	41,9	57,5	66,7	43,6	58,1	58,2	60,0	57,1	59,2
matraz 2	44,6	32,9	45,4	63,0	43,9	57,3	57,7	59,9	60,4	62,0
promedio	43,5	37,4	51,5	64,9	43,8	57,7	57,9	59,9	58,8	60,6
% DHA										
matraz 1	41,1	38,0	47,6	47,1	36,6	45,1	46,0	44,6	43,8	38,0
matraz 2	40,2	40,8	40,0	46,7	39,0	45,5	45,1	45,9	46,7	40,2
promedio	40,7	39,4	43,8	46,9	37,0	45,3	45,5	45,2	45,2	39,1
DHA (mg/g)										
matraz 1	172,7	157,5	270,6	311,0	157,7	259,4	264,6	264,2	247,3	222,3
matraz 2	177,2	132,8	179,6	290,9	169,2	257,3	257,1	271,7	278,5	246,0
promedio	175,0	145,2	225,1	300,9	163,5	258,4	260,9	267,9	262,9	234,2
% Grasa (en mg/g)										
matraz 1	42,0	41,4	56,9	66,0	43,1	57,5	57,5	59,3	56,5	58,5
matraz 2	44,1	32,5	44,9	62,3	43,4	56,6	57,0	59,2	59,7	61,3
promedio	43,0	37,0	50,9	64,1	43,2	57,0	57,3	59,3	58,1	59,9
Grasa (g/l)										
matraz 1	1,1	1,0	2,4	3,0	1,1	2,2	2,2	2,3	2,1	2,3
matraz 2	1,2	1,0	1,3	2,7	1,2	2,1	2,2	2,4	2,5	2,7
promedio	1,1	1,0	1,8	2,9	1,1	2,2	2,2	2,3	2,3	2,5
Rendimiento DHA (g/l)										
matraz 1	0,4	0,4	1,1	1,4	0,4	1,0	1,0	1,0	0,9	0,9
matraz 2	0,5	0,4	0,5	1,3	0,5	1,0	1,0	1,1	1,2	1,1
promedio	0,5	0,4	0,8	1,3	0,4	1,0	1,0	1,1	1,0	1,0
% EPA										
matraz 1	22,8	27,1	17,8	16,7	29,2	21,6	20,0	21,9	22,2	31,3
matraz 2	24,5	24,4	26,7	19,5	26,3	21,0	20,9	20,5	19,2	28,5
promedio	23,6	25,7	22,3	18,1	27,7	21,3	20,4	21,2	20,7	29,9
EPA (mg/g)										
matraz 1	94,9	111,3	100,5	109,1	124,9	123,0	114,1	128,8	124,1	181,9
matraz 2	106,9	78,5	118,8	120,4	113,0	118,1	117,9	120,4	113,7	173,2
promedio	100,9	94,9	109,7	114,7	119,0	120,5	116,0	124,6	118,9	177,6
Rendimiento EPA										
matraz 1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,3	0,5	0,4	0,5	0,5	0,7
matraz 2	0,3	0,3	0,3	0,5	0,3	0,4	0,5	0,5	0,5	0,8
promedio	0,3	0,3	0,4	0,5	0,3	0,5	0,4	0,5	0,5	0,7
L-F DW (g/l)										
matraz 1	1,5	1,5	1,8	1,5	1,4	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
matraz 2	1,5	2,1	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,7	1,7
promedio	1,5	1,8	1,7	1,6	1,5	1,6	1,6	1,6	1,6	1,7
% 16:0										
matraz 1	24,1	23,1	22,7	24,5	22,4	21,6	22,3	21,7	22,3	17,8
matraz 2	23,6	23,1	21,6	22,0	22,9	21,8	22,5	21,9	22,2	18,4
promedio	23,9	23,1	21,1	23,3	22,7	21,7	22,4	21,8	22,2	18,1

% DPA n-3										
matraz 1	1,5	1,4	1,2	1,2	1,5	1,1	1,2	1,1	1,1	1,4
matraz 2	1,5	1,3	1,5	1,1	1,4	1,1	1,1	1,1	1,2	1,3
promedio	1,5	1,4	1,4	1,2	1,5	1,1	1,2	1,1	1,1	1,3
% DPA n-6										
matraz 1	1,6	1,2	2,4	2,3	1,1	2,1	2,2	2,0	1,9	1,4
matraz 2	1,5	1,6	1,4	2,2	1,3	2,1	2,1	2,2	2,2	1,3
promedio	1,5	1,4	1,9	2,3	1,2	2,1	2,1	2,1	2,1	1,3
% Omega-3 totales										
matraz 1	65,4	66,6	66,6	65,0	67,3	67,8	67,2	67,6	67,0	70,7
matraz 2	66,2	66,5	68,2	67,3	66,8	67,6	67,0	67,5	67,1	70,0
promedio	65,8	66,5	67,4	66,2	67,0	67,7	67,1	67,5	67,0	70,3
pH										
matraz 1	6,83	6,84	6,82	6,84	6,83	6,84	6,84	6,84	6,86	6,85
matraz 2	6,82	6,84	6,81	6,84	6,83	6,84	6,84	6,84	6,84	6,85
promedio	6,83	6,84	6,82	6,84	6,83	6,84	6,84	6,84	6,85	6,85

Ejemplo 12

Nº de Registro de la ATCC PTA-10208 Gradientes de Vitamina B12 con CO₂ al 10%

Experimentos realizados para determinar la concentración de Vitamina B12 que proporciona desarrollo de PTA-10208 y productividad de EPA óptimos.

5 **Temperatura:** 23 °C

Velocidad del Agitador: 200 rpm

Medio de Base: SDFM-O definido (DSDFM-O)

10 **Inóculo:** Se descongeló un vial de PTA-10208 en SDFM-O en condiciones ambientales. Se transfirieron 2 ml de cultivo a 48 ml de DSDFM-O con CO₂ al 10%. Se transfirió el cultivo a DSDFM-O (CO₂ al 10%) reciente (véase la Tabla 22). Se transfirió el cultivo a DSDFM-O (CO₂ al 10%) reciente. Se usó el cultivo para inocular el experimento con gradiente de Vitamina B12 Semana nº 1 (2 ml/matraz) (CO₂ al 10%).

Situación Experimental:

15 Todos los cultivos se desarrollaron en matraces para agitación de 50 ml y se desarrollaron matraces duplicados para cada condición. Se inoculó PTA-10208 en los gradientes de vitamina B12 de nueve días en DSDFM-O (sin tasona) cada siete días. Los inóculos para cada concentración de vitamina B12 se mantenían a lo largo del transcurso del experimento. Al continuar transfiriendo PTA-10208 en concentraciones reducidas de vitamina B12, la vitamina B12 en exceso se depuraba eficazmente de las células. Se transfirieron cada siete días inóculos para cada concentración de vitamina B12. Se usaron inóculos de cuatro días para iniciar cada gradiente de vitamina B12 de nueve días. Cada gradiente de nueve días se marca consecutivamente como Grupo de Experimentos A, B, C, D, E, F, G, H, I, J y K

20 posteriormente en la Tabla 23. Antes de cada inoculación de gradiente, se midió la densidad óptica para cada concentración de vitamina B12 a fin de transferir aproximadamente la misma cantidad de células. Después de nueve días de desarrollo, todos los cultivos se recogieron para medir el pH, el peso seco y el perfil de ácidos grasos. El experimento se finalizó una vez que se encontrara que los pesos secos a cada concentración de vitamina B12 se habían estabilizado durante al menos tres gradientes de nueve días consecutivos.

25

Tabla 22. Medio del Fermentador a Escala Reducida Definido para Orca (DSDFM-O)

Componente	Cantidad por litro (g)	[Solución madre] (g/l)	ml de solución madre a usar por litro		g/l						mg/l						
NaCl	0,625	seco															
Na ₂ SO ₄	7,52	seco															
K ₂ SO ₄	0,1	50	2 ml														
KCl	1	50	20 ml														
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5	227	22 ml														
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,217	190	1,14 ml														
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,29	seco															
Monohidrato de MSG	2,16	seco															
HEPES (100 mM) pH 7	23,8	seco															
KH ₂ PO ₄	0,136	56,5	2,4														
Glucosa	50	500	100 ml														
Solución de Citrato Fe		véase posteriormente	10 ml														
Metales Vestigiales		véase posteriormente	1 ml														
Vitaminas		véase posteriormente	1 ml														
Solución de Citrato Fe																	

Componente	Cantidad por litro (g)	[Solución madre] (g/l)	ml de solución madre a usar por litro		g/l					mg/l						
					Na	K	Mg	Ca	Cl	Cu	Mn	Co	Zn			
Ácido cítrico	1175 mg	117,5														
FeSO ₄ .7H ₂ O	10,3 mg	1,03								2,07						
Solución de Metales Vestigiales																
MnCl ₂ .4H ₂ O	3,1 mg	3,1									0,86					
ZnSO ₄ .7H ₂ O	9,3 mg	9,3													2,12	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,04 mg	0,04														
CuSO ₄ .5H ₂ O	2,07 mg	2,07								0,53						
NiSO ₄ .6H ₂ O	2,07 mg	2,07														
pH hasta 2,5 con HCl																
Solución de Vitaminas																
Vitamina B12	0,768 mg	0,768														
Tiamina	11,7 mg	11,7														
Pantotenato Ca	3,996 mg	3,996														
Biotina	0,00434 mg	4,34 mg														
IONES Totales (ppm)						607,32						995,8536				

Tabla 23

[] Vitamina B12	mg/l de Vitamina B12
5x	3,84
1x	0,77
1/2x	0,38
1/5x	0,15
1/10x	0,077
1/20x	0,038
1/50x	0,015
1/100x	0,0077
1/500x	0,0015
0x	0

- 5 Se llevaron a cabo siete gradientes de 5x a 1/500 x vitamina B12 consecutivos. Al final del último experimento, se inició un nuevo experimento comparando el desarrollo de PTA-10208 y la producción de EPA a 1/500x (0,0015 mg/l) y 0x (0 mg/l de vitamina B12). Se llevaron a cabo cuatro experimentos de 1/500x frente a 0x vitamina B12 consecutivos.

Resultados:

- 10 (Para 5x --> 1/500x vitamina B12): Para siete experimentos de nueve días consecutivos, el peso seco de PAT-10208, el % de EPA, el % de DHA, el % de grasa y el rendimiento de EPA no cambiaban en las concentraciones de vitamina B12 que variaban de 5x (3,84 mg/l) a 1/500x (0,0015 mg/l).

- 15 (Para 1/500x y 0x vitamina B12): Los resultados a lo largo del transcurso de cuatro experimentos de nueve días consecutivos muestran que el desarrollo de PTA-10208 en DSDFM-O que contiene 0 mg/l de vitamina B12 tiene un % de EPA muy superior que cuando se desarrollaba con solo 1/500x (0,0015 mg/l) vitamina B12. Mientras que el % de EPA se incrementa desde alrededor de 18% con 1/500x (0,0015 mg/l) vitamina B12 hasta alrededor de 27% sin vitamina B12, el % de DHA disminuye desde alrededor de 45% con 1/500x (0,0015 mg/l) vitamina B12 hasta alrededor de 36% sin vitamina B12. El peso seco de PTA-10208 y el % de grasa se incrementan ligeramente cuando la vitamina B12 se retira completamente del DSDFM-O. Como resultado del incremento en el % de EPA y los ligeros incrementos en el peso seco y el % de grasa, el rendimiento de EPA de PTA-10208 se incrementa en alrededor de 60% cuando la vitamina B12 se retira del DSDFM-O.

Los resultados también se muestran en las Figuras 20 - 49 y en las tablas posteriores.

Grupo de Experimentos	MUESTRA	INOC. 600 nm	mg/l de Vit B12	pH	Tara (g)	Sobrepeso (g)	Peso seco de la pella (g)	g/l de Biomasa
		O.D.						
A	5x (1)		3,84	6,80	10,4757	10,723	0,2473	4,95
	5x (2)		3,84	6,80	10,4534	10,689	0,2356	4,71
	1x (1)		0,77	6,80	10,5142	10,7449	0,2307	4,61
	1x (2)		0,77	6,81	10,431	10,6512	0,2202	4,40
	1/2x (1)		0,38	6,82	10,5684	10,7882	0,2198	4,40
	1/2x (2)		0,38	6,82	10,6373	10,8691	0,2318	4,64
	1/5x (1)		0,15	6,81	10,5044	10,7348	0,2304	4,61
	1/5x (2)		0,15	6,82	10,5219	10,747	0,2251	4,50
	1/10x (1)		0,077	6,83	10,5221	10,7481	0,226	4,52
	1/10x (2)		0,077	6,83	10,4705	10,6979	0,2274	4,55
	1/20x (1)		0,038	6,83	10,4743	10,6988	0,2245	4,49

ES 2 774 778 T3

Grupo de Experimentos	MUESTRA	INOC. 600 nm	mg/l de Vit B12	pH	Tara (g)	Sobrepeso (g)	Peso seco de la pella (g)	g/l de Biomasa
		O.D.						
	1/20x (2)		0,038	6,83	10,7322	10,9646	0,2324	4,65
	1/50x (1)		0,015	6,84	10,4777	10,6945	0,2168	4,34
	1/50x (2)		0,015	6,85	10,4766	10,7018	0,2252	4,50
	1/100x (1)		0,0077	6,84	10,4543	10,6863	0,232	4,64
	1/100x (2)		0,0077	6,85	10,5041	10,7452	0,2411	4,82
	1/500x (1)		0,0015	6,86	10,5152	10,7563	0,2411	4,82
	1/500x (2)		0,0015	6,85	10,574	10,8081	0,2341	4,68
B	5x (1)	4,0445	3,84	6,63	10,5021	10,7338	0,2317	4,63
	5x (2)	4,0445	3,84	6,65	10,4735	10,7152	0,2417	4,83
	1x (1)	4,3024	0,77	6,64	10,5011	10,7394	0,2383	4,77
	1x (2)	4,3024	0,77	6,65	10,4004	10,6362	0,2358	4,72
	1/2x (1)	4,1648	0,38	6,64	10,4599	10,71	0,2501	5,00
	1/2x (2)	4,1648	0,38	6,64	10,5630	10,804	0,241	4,82
	1/5x (1)	4,1600	0,15	6,63	10,6521	10,889	0,2369	4,74
	1/5x (2)	4,1600	0,15	6,63	10,5032	10,7341	0,2309	4,62
	1/10x (1)	4,4997	0,077	6,65	10,4726	10,6998	0,2272	4,54
	1/10x (2)	4,4997	0,077	6,64	10,4841	10,7279	0,2438	4,88
	1/20x (1)	4,9716	0,038	6,64	10,3785	10,6112	0,2327	4,65
	1/20x (2)	4,9716	0,038	6,64	10,3832	10,6154	0,2322	4,64
	1/50x (1)	4,3049	0,015	6,65	10,3782	10,612	0,2338	4,68
	1/50x (2)	4,3049	0,015	6,65	10,5546	10,7877	0,2331	4,66
	1/100x (1)	4,6035	0,0077	6,65	10,4858	10,7172	0,2314	4,63
	1/100x (2)	4,6035	0,0077	6,66	10,4771	10,7122	0,2351	4,70
	1/500x (1)	4,4494	0,0015	6,65	10,6083	10,8163	0,208	4,16
	1/500x (2)	4,4494	0,0015	6,65	10,5722	10,7896	0,2174	4,35
C	5x (1)	4,1784	3,84	6,77	10,4842	10,7237	0,2395	4,79
	5x (2)	4,1784	3,84	6,80	10,5261	10,7553	0,2292	4,58
	1x (1)	4,2842	0,77	6,80	10,3785	10,6194	0,2409	4,82
	1x (2)	4,2842	0,77	6,77	10,6083	10,8459	0,2376	4,75
	1/2x (1)	4,8865	0,38	6,81	10,5274	10,7183	0,1909	3,82
	1/2x (2)	4,8865	0,38	6,81	10,4713	10,6853	0,214	4,28
	1/5x (1)	4,5411	0,15	6,81	10,3831	10,5997	0,2166	4,33
	1/5x (2)	4,5411	0,15	6,84	10,5444	10,7666	0,2222	4,44
	1/10x (1)	5,2960	0,077	6,80	10,501	10,7181	0,2171	4,34
	1/10x (2)	5,2960	0,077	6,82	10,3783	10,5978	0,2195	4,39
	1/20x (1)	5,2480	0,038	6,82	10,4521	10,6539	0,2018	4,04
	1/20x (2)	5,2480	0,038	6,83	10,4018	10,5881	0,1863	3,73
	1/50x (1)	5,6680	0,015	6,82	10,5049	10,7248	0,2199	4,40
	1/50x (2)	5,6680	0,015	6,83	10,4197	10,6441	0,2244	4,49
	1/100x (1)	4,9024	0,0077	6,83	10,5531	10,7847	0,2316	4,63
	1/100x (2)	4,9024	0,0077	6,83	10,7098	10,9412	0,2314	4,63
	1/500x (1)	4,6011	0,0015	6,83	10,5543	10,7942	0,2399	4,80

ES 2 774 778 T3

Grupo de Experimentos	MUESTRA	INOC. 600 nm	mg/l de Vit B12	pH	Tara (g)	Sobrepeso (g)	Peso seco de la pella (g)	g/l de Biomasa
		O.D.						
	1/500x (2)	4,6011	0,0015	6,83	10,3382	10,5746	0,2364	4,73
D	5x (1)	4,3297	3,84	6,85	10,3415	10,5976	0,2561	5,12
	5x (2)	4,3297	3,84	6,85	10,4549	10,698	0,2431	4,86
	1x (1)	5,3731	0,77	6,85	10,3785	10,6143	0,2358	4,72
	1x (2)	5,3731	0,77	6,85	10,6117	10,8401	0,2284	4,57
	1/2x (1)	4,9040	0,38	6,85	10,4318	10,6573	0,2255	4,51
	1/2x (2)	4,9040	0,38	6,85	10,6572	10,8742	0,217	4,34
	1/5x (1)	4,7084	0,15	6,85	10,552	10,7791	0,2271	4,54
	1/5x (2)	4,7084	0,15	6,85	10,7118	10,9623	0,2505	5,01
	1/10x (1)	4,9843	0,077	6,85	10,6174	10,8589	0,2415	4,83
	1/10x (2)	4,9843	0,077	6,86	10,5229	10,7614	0,2385	4,77
	1/20x (1)	4,7533	0,038	6,84	10,5045	10,7446	0,2401	4,80
	1/20x (2)	4,7533	0,038	6,84	10,5049	10,7281	0,2232	4,46
	1/50x (1)	4,3732	0,015	6,86	10,5161	10,7566	0,2405	4,81
	1/50x (2)	4,3732	0,015	6,85	10,5234	10,7574	0,234	4,68
	1/100x (1)	4,0902	0,0077	6,86	10,4858	10,7193	0,2335	4,67
	1/100x (2)	4,0902	0,0077	6,86	10,5523	10,7856	0,2333	4,67
	1/500x (1)	4,2472	0,0015	6,86	10,553	10,8032	0,2502	5,00
	1/500x (2)	4,2472	0,0015	6,86	10,4488	10,6976	0,2488	4,98
E	5x (1)	4,5635	3,84	6,79	10,3613	10,6103	0,249	4,98
	5x (2)	4,5635	3,84	6,80	10,5311	10,7546	0,2235	4,47
	1x (1)	4,2673	0,77	6,80	10,3311	10,5651	0,234	4,68
	1x (2)	4,2673	0,77	6,80	10,466	10,7162	0,2502	5,00
	1/2x (1)	5,1989	0,38	6,79	10,6796	10,9054	0,2258	4,52
	1/2x (2)	5,1989	0,38	6,80	10,5552	10,7836	0,2284	4,57
	1/5x (1)	5,0275	0,15	6,80	10,4877	10,721	0,2333	4,67
	1/5x (2)	5,0275	0,15	6,80	10,5061	10,7331	0,227	4,54
	1/10x (1)	5,6680	0,077	6,81	10,3585	10,5946	0,2361	4,72
	1/10x (2)	5,6680	0,077	6,80	10,6807	10,9116	0,2309	4,62
	1/20x (1)	5,2891	0,038	6,81	10,3664	10,6143	0,2479	4,96
	1/20x (2)	5,2891	0,038	6,81	10,3745	10,6253	0,2508	5,02
	1/50x (1)	5,0356	0,015	6,81	10,4285	10,682	0,2535	5,07
	1/50x (2)	5,0356	0,015	6,80	10,4022	10,6524	0,2502	5,00
	1/100x (1)	5,7271	0,0077	6,81	10,3332	10,5937	0,2605	5,21
	1/100x (2)	5,7271	0,0077	6,81	10,525	10,7782	0,2532	5,06
	1/500x (1)	5,1000	0,0015	6,81	10,4192	10,6785	0,2593	5,19
	1/500x (2)	5,1000	0,0015	6,81	10,3991	10,6668	0,2677	5,70
F	5x (1)	4,5635	3,84	6,75	10,524	10,7696	0,2456	5,23
	5x (2)	4,5635	3,84	6,75	10,3291	10,5729	0,2438	4,88
	1x (1)	4,2673	0,77	6,75	10,4927	10,7424	0,2497	4,99
	1x (2)	4,2673	0,77	6,76	10,5257	10,7652	0,2395	4,79

ES 2 774 778 T3

Grupo de Experimentos	MUESTRA	INOC. 600 nm O.D.	mg/l de Vit B12	pH	Tara (g)	Sobrepeso (g)	Peso seco de la pella (g)	g/l de Biomasa
	1/2x (1)	5,1989	0,38	6,75	10,463	10,6908	0,2278	4,56
	1/2x (2)	5,1989	0,38	6,76	10,3756	10,6003	0,2247	4,49
	1/5x (1)	5,0275	0,15	6,76	10,4212	10,6704	0,2492	4,98
	1/5x (2)	5,0275	0,15	6,76	10,5061	10,7509	0,2448	4,90
	1/10x (1)	5,6680	0,077	6,76	10,3829	10,6062	0,2233	4,47
	1/10x (2)	5,6680	0,077	6,76	10,3651	10,6068	0,2417	4,83
	1/20x (1)	5,2891	0,038	6,75	10,5096	10,7442	0,2346	4,69
	1/20x (2)	5,2891	0,038	6,77	10,3875	10,6226	0,2351	4,70
	1/50x (1)	5,0356	0,015	6,78	10,3584	10,6063	0,2479	4,96
	1/50x (2)	5,0356	0,015	6,76	10,5235	10,7671	0,2436	4,87
	1/100x (1)	5,7271	0,0077	6,77	10,3664	10,6148	0,2484	4,97
	1/100x (2)	5,7271	0,0077	6,78	10,5055	10,7441	0,2386	4,77
	1/500x (1)	5,1000	0,0015	6,79	10,3322	10,5868	0,2546	5,09
	(2)	5,1000	0,0015	6,80	10,3279	10,591	0,2631	5,26
G	5x (1)	3,7017	3,84	6,83	10,362	10,6077	0,2457	4,91
	5x (2)	3,7017	3,84	6,82	10,3595	10,6145	0,255	5,10
	1x (1)	4,2905	0,77	6,84	10,3648	10,6151	0,2503	5,01
	1x (2)	4,2905	0,77	6,85	10,3356	10,5972	0,2616	5,23
	1/2x (1)	4,4548	0,38	6,84	10,5096	10,7683	0,2587	5,17
	1/2x (2)	4,4508	0,38	6,84	10,435	10,6889	0,2539	5,08
	1/5x (1)	4,6844	0,15	6,84	10,3305	10,5868	0,2563	5,13
	1/5x (2)	4,6844	0,15	6,85	10,4964	10,7476	0,2512	5,02
	1/10x (1)	5,8389	0,077	6,85	10,3637	10,6173	0,2536	5,07
	1/10x (2)	5,8389	0,077	6,85	10,3351	10,5881	0,253	5,06
	1/20x (1)	4,4483	0,038	6,85	10,4393	10,6958	0,2565	5,13
	1/20x (2)	4,4483	0,038	6,86	10,3798	10,6416	0,2618	5,24
	1/50x (1)	3,9821	0,015	6,86	10,3619	10,619	0,2571	5,14
	1/50x (2)	3,9821	0,015	6,87	10,5179	10,7721	0,2542	5,08
	1/100x (1)	5,0043	0,0077	6,87	10,4756	10,7288	0,2532	5,06
	1/100x (2)	5,0043	0,0077	6,87	10,4993	10,7561	0,2568	5,14
	1/500x (1)	5,0108	0,0015	6,88	10,434	10,6941	0,2601	5,20
	1/500x (2)	5,0108	0,0015	6,87	10,3896	10,6446	0,255	5,10
H	1/500x (1)	4,6921	0,0015	6,85	10,3599	10,5954	0,2355	4,71
	1/500x (2)	4,6921	0,0015	6,85	10,3720	10,6254	0,2534	5,07
	0x (1)	4,8144	0,0000	6,85	10,3624	10,6052	0,2428	4,86
	0x (2)	4,8144	0,0000	6,86	10,3585	10,6093	0,2508	5,02
I	1/500x (1)	4,7906	0,0015	6,89	10,5492	10,7920	0,2428	4,86
	1/500x (2)	4,7906	0,0015	6,90	10,5958	10,8508	0,255	5,10
	0x (1)	4,7063	0,0000	6,89	10,5505	10,8037	0,2532	5,06
	0x (2)	4,7063	0,0000	6,89	10,5120	10,7693	0,2573	5,15
J	1/500x (1)	5,8805	0,0015	6,99	10,5433	10,8089	0,2656	5,31

Grupo de Experimentos	MUESTRA	INOC. 600 nm	mg/l de Vit B12	pH	Tara (g)	Sobrepeso (g)	Peso seco de la pella (g)	g/l de Biomasa
		O.D.						
	1/500x (2)	5,8805	0,0015	7,00	10,5974	10,8714	0,274	5,48
	0x (1)	4,6385	0,0000	7,00	10,5509	10,8145	0,2636	5,27
	0x (2)	4,6385	0,0000	6,98	10,5462	10,8252	0,279	5,58
K	1/500x (1)	4,7133	0,0015	6,87	10,5424	10,8085	0,2661	5,32
	1/500x (2)	4,7133	0,0015	6,88	10,3444	10,6111	0,2667	5,33
	0x (1)	4,2141	0,0000	6,86	10,3873	10,6587	0,2714	5,43
	0x (2)	4,2141	0,0000	6,86	10,4188	10,6866	0,2678	5,36
Grupo de Experimentos	MUESTRA	% 16:0	% ARA	% EPA	(n-6) DPA	(n-3) DPA	% DHA	% de Grasa
A	5x (1)	27,53	1,67	16,01	2,22	2,33	41,72	67,22
	5x (2)	27,65	1,71	16,02	2,16	2,41	41,17	66,07
	1x (1)	27,73	1,72	16,00	2,15	2,44	41,06	66,25
	1x (2)	27,72	1,75	16,32	2,10	2,48	40,46	65,42
	1/2x (1)	27,86	1,74	16,36	2,09	2,49	40,54	65,45
	1/2x (2)	27,73	1,77	16,53	2,14	2,32	40,93	66,57
	1/5x (1)	27,60	1,73	16,33	2,13	2,38	41,03	66,59
	1/5x (2)	27,88	1,74	15,94	2,17	2,43	41,04	66,28
	1/10x (1)	27,87	1,75	16,28	2,09	2,56	40,66	65,14
	1/10x (2)	27,81	1,74	16,07	2,13	2,48	40,96	65,39
	1/20x (1)	27,70	1,75	16,36	2,08	2,52	40,53	65,64
	1/20x (2)	27,63	1,75	16,42	2,13	2,36	40,93	66,30
	1/50x (1)	27,83	1,76	16,61	2,07	2,43	40,60	66,02
	1/50x (2)	27,82	1,69	16,35	2,11	2,49	40,84	64,97
	1/100x (1)	27,50	1,72	16,13	2,16	2,50	41,19	66,21
	1/100X (2)	27,60	1,69	15,64	2,24	2,34	41,72	66,56
	1/500x (1)	27,58	1,70	15,63	2,24	2,28	41,74	66,99
	1/500x (2)	27,57	1,75	16,86	2,06	2,41	40,59	64,91
B	5x (1)	28,30	1,75	16,44	2,32	2,35	42,35	64,09
	5x (2)	28,45	1,74	15,96	2,36	2,36	42,62	62,46
	1x (1)	28,55	1,74	16,10	2,32	2,43	42,35	62,96
	1x (2)	28,47	1,78	16,33	2,33	2,44	42,26	63,13
	1/2x (1)	28,21	1,71	15,90	2,39	2,34	42,95	64,75
	1/2x (2)	28,15	1,75	16,65	2,29	2,33	42,32	63,50
	1/5x (1)	28,51	1,74	16,34	2,29	2,37	42,23	62,02
	1/5x (2)	28,43	1,75	16,35	2,29	2,48	42,24	63,88
	1/10x (1)	28,66	1,77	15,85	2,37	2,45	42,45	62,47
	1/10x (2)	28,52	1,74	15,74	2,40	2,39	42,70	63,14
	1/20x (1)	28,67	1,75	15,86	2,33	2,37	42,55	63,10
	1/20x (2)	28,36	1,75	16,13	2,35	2,26	42,62	63,90
	1/50x (1)	28,36	1,79	16,64	2,29	2,42	42,04	62,31
	1/50x (2)	28,43	1,77	15,92	2,40	2,42	42,57	62,77

ES 2 774 778 T3

Grupo de Experimentos	MUESTRA	% 16:0	% ARA	% EPA	(n-6) DPA	(n-3) DPA	% DHA	% de Grasa
	1/100x (1)	28,81	1,75	16,01	2,30	2,49	42,16	61,70
	1/100x (2)	28,61	1,73	15,93	2,35	2,40	42,51	63,60
	1/500x (1)	28,62	1,85	17,15	2,17	2,59	41,19	60,91
	1/500x (2)	28,30	1,84	17,39	2,20	2,43	41,40	61,56
C	5x (1)	27,97	1,95	16,08	2,60	2,43	42,37	67,30
	5x (2)	28,24	1,96	15,99	2,55	2,54	42,02	66,72
	1x (1)	28,20	1,94	15,96	2,60	2,61	42,06	66,98
	1x (2)	28,10	1,98	16,39	2,54	2,64	41,73	66,30
	1/2x (1)	27,77	2,14	17,67	2,40	2,85	40,46	64,53
	1/2x (2)	27,84	2,10	17,27	2,50	2,62	40,85	65,79
	1/5x (1)	27,57	2,06	17,37	2,46	2,64	41,17	66,69
	1/5x (2)	27,71	2,05	17,05	2,50	2,70	41,31	65,86
	1/10x (1)	28,02	2,06	16,89	2,48	2,70	41,27	65,53
	1/10x (2)	27,66	2,05	16,76	2,55	2,64	41,66	65,85
	1/20x (1)	27,64	2,13	17,27	2,52	2,74	41,03	65,00
	1/20x (2)	27,56	2,19	18,62	2,27	2,88	39,82	64,23
	1/50x (1)	27,78	2,02	16,98	2,51	2,52	41,61	66,22
	1/50x (2)	27,82	2,01	16,92	2,53	2,65	41,47	65,85
	1/100x (1)	27,85	2,01	16,77	2,54	2,67	41,50	65,23
	1/100x (2)	27,91	2,01	16,61	2,58	2,59	41,72	66,87
	1/500x (1)	27,73	2,02	17,42	2,41	2,58	41,10	65,60
	1/500x (2)	27,48	2,05	17,93	2,39	2,54	40,85	65,85
D	5x (1)	27,80	1,85	15,97	2,59	2,32	42,99	67,08
	5x (2)	27,89	1,86	16,27	2,52	2,42	42,60	66,60
	1x (1)	27,60	1,92	16,59	2,54	2,53	42,42	66,32
	1x (2)	27,75	1,89	16,40	2,53	2,48	42,60	66,35
	1/2x (1)	27,35	1,98	17,19	2,52	2,53	41,97	65,19
	1/2x (2)	27,26	2,01	17,65	2,45	2,45	41,58	66,67
	1/5x (1)	27,42	1,97	17,53	2,42	2,55	41,72	66,69
	1/5x (2)	27,46	1,91	16,60	2,60	2,45	42,44	66,58
	1/10x (1)	27,45	1,97	17,03	2,50	2,61	42,04	66,06
	1/10x (2)	27,45	1,90	16,66	2,52	2,46	42,46	66,91
	1/20x (1)	27,45	1,96	16,95	2,58	2,41	42,11	66,10
	1/20x (2)	27,30	2,00	17,94	2,42	2,45	41,50	65,30
	1/50x (1)	27,58	1,87	16,65	2,55	2,33	42,61	66,84
	1/50x (2)	27,69	1,89	16,85	2,50	2,44	42,27	65,40
	1/100x (1)	27,44	1,92	16,88	2,51	2,51	42,38	65,88
	1/100x (2)	27,47	1,92	16,67	2,58	2,43	42,56	65,83
	1/500x (1)	26,91	1,98	18,05	2,40	2,47	41,66	66,18
	1/500x (2)	27,03	1,99	18,08	2,40	2,36	41,69	65,80
E	5x (1)	27,46	1,89	16,02	2,60	2,30	43,33	66,12
	5x (2)	27,86	1,93	16,05	2,50	2,38	43,02	63,64
	1x (1)	27,75	1,95	15,91	2,58	2,39	43,09	65,41
	1x (2)	27,51	1,94	15,59	2,72	2,29	43,52	67,35

ES 2 774 778 T3

Grupo de Experimentos	MUESTRA	% 16:0	% ARA	% EPA	(n-6) DPA	(n-3) DPA	% DHA	% de Grasa
	1/2x (1)	27,07	2,04	16,99	2,52	2,42	42,64	65,01
	1/2x (2)	26,86	2,05	17,23	2,48	2,35	42,59	65,00
	1/5x (1)	27,05	1,96	16,65	2,55	2,29	43,21	65,66
	1/5x (2)	27,12	1,98	16,69	2,52	2,41	43,08	63,58
	1/10x (1)	27,35	1,95	16,45	2,55	2,48	42,94	64,34
	1/10x (2)	27,31	1,92	16,22	2,60	2,41	43,24	64,49
	1/20x (1)	26,72	1,93	16,73	2,64	2,31	43,21	65,83
	1/20x (2)	26,47	1,94	17,11	2,65	2,21	43,14	66,13
	1/50x (1)	26,63	1,86	16,30	2,72	2,19	43,84	65,30
	1/50x (2)	26,68	1,86	16,33	2,69	2,26	43,76	65,67
	1/100x (1)	26,47	1,87	16,39	2,69	2,28	43,89	63,98
	1/100x (2)	26,45	1,89	16,78	2,62	2,38	43,49	65,21
	1/500x (1)	26,06	1,88	17,13	2,60	2,23	43,73	66,13
	1/500x (2)	25,95	1,88	17,58	2,57	2,10	43,40	65,46
F	5x (1)	25,71	1,96	17,50	2,46	2,34	43,56	65,46
	5x (2)	25,91	1,93	17,26	2,47	2,38	43,73	65,71
	1x (1)	25,93	1,90	16,70	2,54	2,43	43,93	66,05
	1x (2)	26,03	1,94	17,17	2,48	2,39	43,41	65,34
	1/2x (1)	25,76	2,03	18,11	2,43	2,38	42,76	65,27
	1/2x (2)	25,74	2,05	18,52	2,37	2,31	42,52	65,75
	1/5x (1)	25,44	1,95	17,62	2,49	2,27	43,73	65,80
	1/5x (2)	25,41	1,94	17,35	2,52	2,32	43,99	65,88
	1/10x (1)	26,13	2,04	18,06	2,36	2,55	42,43	64,10
	1/10x (2)	25,62	1,98	17,53	2,48	2,44	43,52	65,51
	1/20x (1)	25,77	2,01	17,97	2,45	2,34	42,94	65,21
	1/20x (2)	25,55	2,03	18,45	2,42	2,24	42,78	66,05
	1/50x (1)	25,26	1,96	17,54	2,55	2,18	44,07	66,41
	1/50x (2)	25,48	1,95	17,58	2,50	2,30	43,72	65,93
	1/100x (1)	25,50	1,93	17,00	2,62	2,23	44,36	65,37
	1/100x (2)	25,59	1,96	17,37	2,56	2,26	43,80	65,18
	1/500x (1)	25,54	1,99	18,11	2,45	2,20	43,08	65,05
	1/500x (2)	25,55	2,00	18,59	2,36	2,18	42,66	64,57
G	5x (1)	25,74	1,95	17,58	2,37	2,08	43,04	63,68
	5x (2)	25,79	1,89	16,83	2,51	2,04	43,69	63,67
	1x (1)	26,01	1,90	16,69	2,52	2,08	43,42	64,95
	1x (2)	25,71	1,91	16,74	2,57	1,98	43,85	65,37
	1/2x (1)	25,47	1,93	17,14	2,52	1,97	43,69	64,28
	1/2x (2)	25,68	1,95	17,80	2,42	1,94	42,76	64,15
	1/5x (1)	25,63	1,94	17,43	2,46	2,02	43,21	63,70
	1/5x (2)	25,86	1,91	17,03	2,47	2,04	43,16	64,14
	1/10x (1)	26,34	1,95	17,09	2,48	2,14	42,35	63,27
	1/10x (2)	26,24	1,93	16,79	2,52	2,04	42,93	64,71
	1/20x (1)	25,47	1,97	18,06	2,37	2,12	42,62	63,38
	1/20x (2)	25,38	1,98	18,16	2,40	1,95	42,73	62,81

Grupo de Experimentos	MUESTRA	% 16:0	% ARA	% EPA	(n-6) DPA	(n-3) DPA	% DHA	% de Grasa
	1/50x (1)	25,46	1,94	18,06	2,37	2,02	42,72	63,38
	1/50x (2)	25,50	1,94	17,46	2,46	2,04	43,15	63,66
	1/100x (1)	25,52	1,92	16,69	2,60	1,81	44,16	65,74
	1/100x (2)	25,96	1,92	17,11	2,48	1,96	43,00	63,89
	1/500x (1)	25,71	1,95	17,78	2,41	1,97	42,83	64,61
	1/500x (2)	25,56	2,02	18,25	2,37	1,90	42,63	64,80
H	1/500x (1)	25,19	2,03	19,36	2,14	2,02	41,86	65,21
	1/500x (2)	25,41	1,94	17,85	2,37	1,83	43,31	65,75
	0x (1)	21,45	2,62	27,54	1,31	2,50	35,78	67,83
	0x (2)	21,79	2,63	27,33	1,30	2,51	35,66	67,07
I	1/500x (1)	25,21	2,02	19,89	2,15	2,10	41,48	64,17
	1/500x (2)	25,00	2,02	20,00	2,11	2,09	41,63	64,04
	0x (1)	21,82	2,62	28,55	1,20	2,61	34,16	67,22
	0x (2)	21,66	2,64	28,83	1,18	2,55	34,20	66,93
J	1/500x (1)	24,44	1,81	16,75	2,49	2,22	45,20	63,43
	1/500x (2)	24,34	1,82	17,73	2,39	1,95	44,71	63,88
	0x (1)	21,56	2,58	26,96	1,30	2,60	36,04	66,74
	0x (2)	21,53	2,61	27,30	1,31	2,43	35,96	65,71
K	1/500x (1)	23,87	1,82	17,33	2,46	2,00	45,45	64,67
	1/500x (2)	24,07	1,82	17,67	2,42	1,93	45,06	64,30
	0x (1)	21,77	2,63	26,13	1,39	2,81	36,49	66,14
	0x (2)	21,91	2,63	27,19	1,29	2,63	35,60	66,81
Grupo de Experimentos	MUESTRA	Rendimiento de EPA (g/l)	mg/g de EPA	Rendimiento de DHA	mg/g de DHA (g/l)	LFDW (g/l)	g B12/g LFDW	g/l de Grasa
A	5x (1)	0,53	107,64	1,39	291,68	1,62	0,0024	3,32
	5x (2)	0,50	105,83	1,28	282,95	1,60	0,0024	3,11
	1x (1)	0,49	105,99	1,26	282,93	1,56	0,00049	3,06
	1x (2)	0,47	106,77	1,17	275,34	1,52	0,00051	2,88
	1/2x (1)	0,47	107,06	1,17	275,98	1,52	0,00025	2,88
	1/2x (2)	0,51	110,04	1,26	283,39	1,55	0,00025	3,09
	1/5x (1)	0,50	108,74	1,26	284,18	1,54	0,00010	3,07
	1/5x (2)	0,48	105,63	1,22	282,95	1,52	0,00010	2,98
	1/10x (1)	0,48	106,01	1,20	275,47	1,58	0,000049	2,94
	1/10x (2)	0,48	105,07	1,22	278,58	1,57	0,000049	2,97
	1/20x (1)	0,48	107,36	1,19	276,71	1,54	0,000025	2,95
	1/20x (2)	0,51	108,87	1,26	282,24	1,57	0,000024	3,08
	1/50x (1)	0,48	109,67	1,16	278,77	1,47	0,000010	2,86
	1/50x (2)	0,48	106,19	1,19	275,96	1,58	0,000010	2,93
	1/100x (1)	0,50	106,81	1,27	283,69	1,57	0,0000049	3,07
	1/100x (2)	0,50	104,11	1,34	288,86	1,61	0,0000048	3,21
	1/500x (1)	0,50	104,66	1,35	290,83	1,59	0,00000094	3,23
	1/500x (2)	0,51	109,46	1,23	274,01	1,64	0,00000091	3,04
B	5x (1)	0,49	105,34	1,26	279,16	1,66	0,0023	2,97

ES 2 774 778 T3

Grupo de Experimentos	MUESTRA	Rendimiento de EPA (g/l)	mg/g de EPA	Rendimiento de DHA	mg/g de DHA (g/l)	LFDW (g/l)	g B12/g LFDW	g/l de Grasa
	5x (2)	0,48	99,71	1,29	273,81	1,81	0,0021	3,02
	1x (1)	0,48	101,34	1,27	274,22	1,77	0,00044	3,00
	1x (2)	0,49	103,10	1,26	274,39	1,74	0,00044	2,98
	1/2x (1)	0,52	102,99	1,39	286,04	1,76	0,00022	3,24
	1/2x (2)	0,51	105,75	1,30	276,38	1,76	0,00022	3,06
	1/5x (1)	0,48	101,36	1,24	269,37	1,80	0,000083	2,94
	1/5x (2)	0,48	104,41	1,25	277,49	1,67	0,000090	2,95
	1/10x (1)	0,45	98,98	1,20	272,75	1,71	0,000045	2,84
	1/10x (2)	0,48	99,38	1,31	277,29	1,80	0,000043	3,08
	1/20x (1)	0,47	100,10	1,25	276,16	1,72	0,000022	2,94
	1/20x (2)	0,48	103,06	1,26	280,15	1,68	0,000023	2,97
	1/50x (1)	0,48	103,67	1,22	269,42	1,76	0,0000085	2,91
	1/50x (2)	0,47	99,90	1,25	274,84	1,74	0,0000086	2,93
	1/100x (1)	0,46	98,77	1,20	267,53	1,77	0,0000043	2,86
	1/100x (2)	0,48	101,29	1,27	278,11	1,71	0,0000045	2,99
	1/500x (1)	0,43	104,49	1,04	258,03	1,63	0,00000092	2,53
	1/500x (2)	0,47	107,03	1,11	262,14	1,67	0,00000090	2,68
C	5x (1)	0,52	108,25	1,37	292,82	1,57	0,0025	3,22
	5x (2)	0,49	106,70	1,29	287,91	1,53	0,0025	3,06
	1x (1)	0,51	106,88	1,36	289,31	1,59	0,00048	3,23
	1x (2)	0,52	108,67	1,31	284,09	1,60	0,00048	3,15
	1/2x (1)	0,44	114,02	1,00	268,13	1,35	0,00028	2,46
	1/2x (2)	0,49	113,61	1,15	275,95	1,46	0,00026	2,82
	1/5x (1)	0,50	115,85	1,19	281,94	1,44	0,00010	2,89
	1/5x (2)	0,50	112,29	1,21	279,43	1,52	0,00010	2,93
	1/10x (1)	0,48	110,70	1,17	277,71	1,50	0,000051	2,85
	1/10x (2)	0,48	110,39	1,20	281,73	1,50	0,000051	2,89
	1/20x (1)	0,45	112,23	1,08	273,88	1,41	0,000027	2,62
	1/20x (2)	0,45	119,57	0,95	262,65	1,33	0,000029	2,39
	1/50x (1)	0,49	112,42	1,21	282,97	1,49	0,000010	2,91
	1/50x (2)	0,50	111,40	1,23	280,41	1,53	0,000010	2,96
	1/100x (1)	0,51	109,40	1,25	278,02	1,61	0,0000048	3,02
	1/100x (2)	0,51	111,08	1,29	286,49	1,53	0,0000050	3,09
	1/500x (1)	0,55	114,30	1,29	276,88	1,65	0,00000091	3,15
	1/500x (2)	0,56	118,05	1,27	276,25	1,61	0,00000093	3,11
D	5x (1)	0,55	107,16	1,48	296,16	1,69	0,0023	3,44
	5x (2)	0,53	108,39	1,38	291,37	1,62	0,0024	3,24
	1x (1)	0,52	110,03	1,33	288,89	1,59	0,00048	3,13
	1x (2)	0,50	108,83	1,29	290,26	1,54	0,00050	3,03
	1/2x (1)	0,51	112,05	1,23	281,00	1,57	0,00024	2,94
	1/2x (2)	0,51	117,67	1,20	284,69	1,45	0,00026	2,89
	1/5x (1)	0,53	116,92	1,26	285,74	1,51	0,00010	3,03
	1/5x (2)	0,55	110,50	1,42	290,20	1,67	0,000090	3,34

Grupo de Experimentos	MUESTRA	Rendimiento de EPA (g/l)	mg/g de EPA	Rendimiento de DHA	mg/g de DHA (g/l)	LFDW (g/l)	g B12/g LFDW	g/l de Grasa
	1/10x (1)	0,54	112,52	1,34	285,20	1,64	0,000047	3,19
	1/10x (2)	0,53	111,48	1,36	291,77	1,58	0,000049	3,19
	1/20x (1)	0,54	112,02	1,34	285,86	1,63	0,000023	3,17
	1/20x (2)	0,52	117,18	1,21	278,32	1,55	0,000025	2,91
	1/50x (1)	0,54	111,32	1,37	292,53	1,59	0,0000094	3,22
	1/50x (2)	0,52	110,19	1,29	283,91	1,62	0,0000093	3,06
	1/100x (1)	0,52	111,21	1,30	286,73	1,59	0,0000048	3,08
	1/100x (2)	0,51	109,75	1,31	287,74	1,59	0,0000048	3,07
	1/500x (1)	0,60	119,41	1,38	283,11	1,69	0,00000089	3,31
	1/500x (2)	0,59	118,98	1,37	281,74	1,70	0,00000088	3,27
E	5x (1)	0,53	105,94	1,43	294,23	1,69	0,0023	3,29
	5x (2)	0,46	102,13	1,22	281,16	1,63	0,0024	2,84
	1x (1)	0,49	104,07	1,32	289,48	1,62	0,00048	3,06
	1x (2)	0,53	104,97	1,47	301,01	1,63	0,00047	3,37
	1/2x (1)	0,50	110,46	1,25	284,65	1,58	0,00024	2,94
	1/2x (2)	0,51	112,01	1,26	284,34	1,60	0,00024	2,97
	1/5x (1)	0,51	109,31	1,32	291,38	1,60	0,000094	3,06
	1/5x (2)	0,48	106,13	1,24	281,31	1,65	0,000091	2,89
	1/10x (1)	0,50	105,82	1,30	283,74	1,68	0,000046	3,04
	1/10x (2)	0,48	104,57	1,29	286,39	1,64	0,000047	2,98
	1/20x (1)	0,55	110,12	1,41	292,12	1,69	0,000022	3,26
	1/20x (2)	0,57	113,13	1,43	293,02	1,70	0,000022	3,32
	1/50x (1)	0,54	106,44	1,45	294,03	1,76	0,0000085	3,31
	1/50x (2)	0,54	107,21	1,44	295,14	1,72	0,0000087	3,29
	1/100x (1)	0,55	104,88	1,46	288,40	1,88	0,0000041	3,33
	1/100x (2)	0,55	109,40	1,44	291,26	1,76	0,0000044	3,30
	1/500x (1)	0,59	113,27	1,50	296,97	1,76	0,00000085	3,43
	1/500x (2)	0,66	115,09	1,62	291,79	1,97	0,00000076	3,73
F	5x (1)	0,60	114,57	1,49	292,02	1,80	0,00212779	3,42
	5x (2)	0,55	113,41	1,40	294,25	1,67	0,00229687	3,20
	1x (1)	0,55	110,28	1,45	297,11	1,70	0,00045415	3,30
	1x (2)	0,54	112,21	1,36	290,41	1,66	0,00046376	3,13
	1/2x (1)	0,54	118,20	1,27	285,84	1,58	0,00024017	2,97
	1/2x (2)	0,55	121,79	1,26	286,25	1,54	0,00024686	2,95
	1/5x (1)	0,58	115,91	1,43	294,66	1,70	0,00008801	3,28
	1/5x (2)	0,56	114,29	1,42	296,75	1,67	0,00008979	3,23
	1/10x (1)	0,52	115,79	1,21	278,51	1,60	0,00004803	2,86
	1/10x (2)	0,56	114,86	1,38	291,97	1,67	0,00004619	3,17
	1/20x (1)	0,55	117,21	1,31	286,75	1,63	0,00002328	3,06
	1/20x (2)	0,57	121,84	1,33	289,39	1,60	0,00002381	3,11
	1/50x (1)	0,58	116,45	1,45	299,69	1,67	0,00000901	3,29
	1/50x (2)	0,56	115,90	1,40	295,17	1,66	0,00000904	3,21

Grupo de Experimentos	MUESTRA	Rendimiento de EPA (g/l)	mg/g de EPA	Rendimiento de DHA	mg/g de DHA (g/l)	LFDW (g/l)	g B12/g LFDW	g/l de Grasa
	1/100x (1)	0,55	111,13	1,44	296,95	1,72	0,00000448	3,25
	1/100x (2)	0,54	113,25	1,36	292,35	1,66	0,00000463	3,11
	1/500x (1)	0,60	117,81	1,43	286,97	1,78	0,00000084	3,31
	1/500x (2)	0,63	120,03	1,45	282,05	1,86	0,00000080	3,40
G	5x (1)	0,55	111,96	1,35	279,27	1,78	0,00215168	3,13
	5x (2)	0,55	107,14	1,42	283,43	1,85	0,00207251	3,25
	1x (1)	0,54	108,42	1,41	287,31	1,75	0,00043883	3,25
	1x (2)	0,57	109,44	1,50	292,04	1,81	0,00042495	3,42
	1/2x (1)	0,57	110,17	1,45	286,10	1,85	0,00020558	3,33
	1/2x (2)	0,58	114,19	1,39	279,49	1,82	0,00020874	3,26
	1/5x (1)	0,57	111,03	1,41	280,46	1,86	0,00008062	3,27
	1/5x (2)	0,55	109,25	1,39	282,05	1,80	0,00008326	3,22
	1/10x (1)	0,55	108,14	1,36	273,02	1,86	0,00004134	3,21
	1/10x (2)	0,55	108,66	1,41	283,05	1,79	0,00004313	3,27
	1/20x (1)	0,59	114,48	1,39	275,22	1,88	0,00002023	3,25
	1/20x (2)	0,60	114,04	1,41	273,40	1,95	0,00001951	3,29
	1/50x (1)	0,59	114,46	1,39	275,82	1,88	0,00000797	3,26
	1/50x (2)	0,57	111,16	1,40	279,89	1,85	0,00000812	3,24
	1/100x (1)	0,56	109,75	1,47	295,79	1,73	0,00000444	3,33
	1/100x (2)	0,56	109,31	1,41	279,92	1,85	0,00000415	3,28
	1/500x (1)	0,60	114,86	1,44	281,92	1,84	0,00000081	3,36
	1/500x (2)	0,60	118,27	1,41	281,47	1,79	0,00000084	3,31
H	1/500x (1)	0,59	126,25	1,29	279,17	1,64	0,00000092	3,07
	1/500x (2)	0,59	117,35	1,44	291,28	1,74	0,00000086	3,33
	0x (1)	0,91	186,81	1,18	248,20	1,56	0,00000000	3,29
	0x (2)	0,92	183,32	1,20	244,63	1,65	0,00000000	3,36
I	1/500x (1)	0,62	127,64	1,29	272,24	1,74	0,00000086	3,12
	1/500x (2)	0,65	128,06	1,36	272,66	1,83	0,00000082	3,27
	0x (1)	0,97	191,93	1,16	234,87	1,66	0,00000000	3,40
	0x (2)	0,99	192,97	1,18	234,10	1,70	0,00000000	3,44
J	1/500x (1)	0,56	106,22	1,52	292,66	1,94	0,00000077	3,37
	1/500x (2)	0,62	113,25	1,57	291,57	1,98	0,00000076	3,50
	0x (1)	0,95	179,92	1,27	245,50	1,75	0,00000000	3,52
	0x (2)	1,00	179,38	1,32	241,17	1,91	0,00000000	3,67
K	11500x (1)	0,60	112,09	1,56	298,08	1,88	0,00000080	3,44
	1/500x							
	(2)	0,61	113,60	1,55	293,84	1,90	0,00000079	3,43
	0x (1)	0,94	172,82	1,31	244,79	1,84	0,00000000	3,59
	0x (2)	0,97	181,66	1,27	241,23	1,78	0,00000000	3,58

Conclusión: El desarrollo de PTA-10208 y la productividad de EPA no cambian con concentraciones de vitamina B12 que varían entre 5x (3,84 mg/l) y 1/500x (0,0015 mg/l) en DSDFM-O con CO₂ al 10%. Sin embargo, cuando la vitamina B12 se retira completamente del DSDFM-O, el % de EPA se incrementa en alrededor de 50%, mientras que el peso seco y el % de grasa también se incrementan ligeramente, dando como resultado un incremento de 60% en la productividad de EPA.

Listado de secuencias

<110> Pfeifer III, Joseph W.

Hansen, Jon Milton

García, José R.

5 Dong, Xiao Daniel

Behrens, Paul Warren

Apt, Kirk E.

<120> Microorganismos Productores de Ácido Eicosapentaenoico, Composiciones de Ácidos Grasos y Métodos para la Elaboración y Usos de los Mismos

10 <130> 2715,256PC01

<140> A asignar

< 141> 2012-07-20

<150> 61/510,464

< 151> 2011-07-21

15 <160> 2

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

< 211> 1705

< 212> ADN

20 < 213> Thraustochytrium sp.

<400> 1

ES 2 774 778 T3

aagatacctg gttgatcctg ccagtagtca tacgctcgtc tcaaagatta agccatgcat 60
gtgtcagtat aaatactttt actttgaaac tgcgaacggc tcattaaatc agtaattatc 120
tacatggtaa cgaaaattat atggataacc gtagtaattc tagggctaata acatgcgtaa 180
aatctgggta actggatgca tttattggat tgaagccaac attaaaaggt gattcacgat 240
aactaagcgg agcgttttag gacgctgaat cattcgagtt tctgccctat cagctgtcga 300
tggtaaaggta ttggcttacc atggcgtaa cgggtaacgg agaattaggg ttcgattccg 360
gagagggagc ctgagagacg gctaccacat ccaaggaagg cagcaggcgc gtaaattgcc 420
caatgagaac ttctcgaggc agtgacaaga aatatcaaag tgatgccgtt aggtattgca 480
tttgaatga gaacgatgta caacttctaa cgatgatcaa ttggagggca agtctggtgc 540
cagcagccgc ggtaattcca gctccaatag cgtatactaa cgttgctgca gttaaaacgc 600
ccgtagttag attagtatca tgggtatttta acctatttcg atgaatttga gttgaaagct 660
aggatatata ggaagcgatt cctcatttac tgtaaaaaaa ttagagtgtt tcacacagat 720
cgtaagatcg ggatatatta gtatggaata ataagatagg actttggtgc tattttgttg 780
gtttgcacac caaagtaatg attaataggg acagttgggg gtattcgtat ttaattgtca 840
gaggtgaaat tcttggattt atgaaagacg aactactgcg aaagcattta ccaaggatgt 900
tttcattaat caaggacgaa agttagggga tcgaagatga ttagatacca tcgtagtctt 960
aaccataaac tatgccgact gaggattctt gaaatttgta aatgaattta agagcactcc 1020
atgagaaatc aaagtctttg ggttccgggg ggagtatggt cgcaagtctg aaacttaaag 1080
gaattgacgg aagggcacca ccaggagtgg agcctgcggc ttaatttgac tcaacacggg 1140
aaaacttacc aggtccagac atagttagga ttgacagatt gatagctctt tcttgattct 1200
atgggtggtg gtgcatggcc gttcttagtt ggtggtttga actgtctgct taattgcgtt 1260
aacgaacgag acctcagcct actaaatagt atgttgttta gtaataaatg atatgacttc 1320
ttagagggac atttcgggtt taccggaagg aagtttgagg caataacagg tctgtgatgc 1380
ccttagatgt tctgggccgc acgcgcgcta cactgacgag ctcaacaagt aatatttggt 1440
tgtctggaag gattgcctaa tcttttaaat actcgctcgat atggggctag attcttgtaa 1500
ttattaatct ccaacgagga attcctagta aacgcaagtc atcagcttgc attgattacg 1560
tccctgccct ttgtacacac cgcccgtcgc acctaccgat tggatggtcc ggtgaaatct 1620
tcggatgttt ttttacaata gtagagagac aaaagttgag taaaccttac catctagagg 1680
aaggtgaagt cgtaacaagg atctt 1705

<210> 2

< 211> 1713

5 < 212> DNA

< 213> Schizochytrium sp.

<400> 2

ES 2 774 778 T3

acctggttga tcctgccagc tgtcatttgc tcgtctaaaa gattaagcca tgcattgtcta	60
agtataaaca aattatacgg tgaaactgcg aacggctcat tatatcagtt atagtttctt	120
tgatagtgtg tttctatatc tatttggata actgtggcaa ttctagagct aacacatgct	180
ttcgagtggg acttttttgg accactgcat ttattagatt ttgaagccaa cgtaaaattg	240
gtgattcatg ataactttgc gaatcgcagt agcgtcttgt acgcggcgat gaatcattca	300
agtttctgcc ccatcagctg tcgatggtac ggtattggcc taccatggct ttcacgggtg	360
acggagaatt agggtttgat tccggagagg acgcttgaga gacggcgacc acatccaagg	420
aaggcagcag gcgcgtaaat tacccaatgg ggactccccg aggtagtgtg aagaaataaa	480
aatgaggagc gctttgcgtt tttcaatttg aatgagagaa tcgtacaatc ctcatcgagg	540
atcaattgga gggcaagtct ggtgccagca gccgcggtta ctccagctcc aatagcaaat	600
attagagttg ttgcagttaa aaagctcgta gttgaatttc cgatagtctt tggccgtgtc	660
cttggctctg tatcatgggt ttattgtgcc aagatgatcg tcctctatgg ttagtgatag	720
tcatagtctg ttactgtaaa aaaactggag tgtttaagc atttctttgg gaaaggtaca	780
tattagtata ggataattag ataggacctg tgattcttat ttggttggtt tgtgagtcac	840
ggtaatgatt aatagggaca atcgggggta ttcgaattta attgtcagag gtgaaattct	900
tggatttaag aaagtccaac tactgcgaag gcatttacca aggatgtttt cattaataaa	960
gaacgaaagt taggggatcg aagatgatta gataccatcg tagtcttaac tgtaaaactat	1020
gccgacttgc gattgtccgt cgttggtttt tcaaaaaaga gacctgggca gcagcacatg	1080
agaaatcaaa gtttttgggt tccgggggga gtatggtcgc aaggctgaaa cttaaaggaa	1140
ttgacggaag ggcaccacca ggagtggagc ctgcggctta attcgactca acacgggaaa	1200
acttaccagg tccagacata gtaaggattg acagattgag agctctttct tgattctatg	1260
ggtggtggtg catggccgtt cttagtgggt ggagtgattt gtctgggtta ttccgttaac	1320
gaacgagacc tcagcctact aaatagtggg gcatattgtg agatatgtga caaaaatcgc	1380
ttcttagagg gacatttcgg gtttaccgga aggaagttt aggcaataac aggtctgtga	1440
tgccctaga tgttctgggc cgcacgcgcg ctacaatgac agattcaaca agtccggtag	1500
tggagctttt gcttctctat tattactttt ccgagaggaa tgggttaatct tctaaatgtc	1560
tgtcgtgatg gggctagatt tttgcaatta ttaatctcca acgaggaatt cctagtaaac	1620
gcaagtcac agcttgcatg gattacgtcc ctgccctttg tacacaccgc ccgtcgcacc	1680
taccgattga acggtcctat gaaatcttcg gat	1713

REIVINDICACIONES

1. Un método para elaborar una biomasa de un microorganismo que tiene ácidos grasos y una concentración de EPA, que comprende:

5 (a) fermentar el microorganismo en un recipiente fermentador para producir un caldo de fermentación que tiene una fase acuosa y biomasa, en donde la fase acuosa tiene un gas disuelto, en donde el microorganismo comprende un traustoquitrido que produce una biomasa que tiene al menos 3% de EPA del peso total de los ácidos grasos; y

(b) ajustar el CO₂ disuelto hasta >2% del gas disuelto.

10 2. El método según la reivindicación 1, que comprende además ajustar la presión sobre la biomasa para alcanzar un nivel de EPA deseado en la biomasa.

3. El método según la reivindicación 1 o 2, que comprende además ajustar la temperatura en el caldo para alcanzar un nivel de EPA deseado en la biomasa.

15 4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la cantidad de la biomasa, el EPA o el DHA se mide antes de ajustar el CO₂ disuelto.

5. Un método para producir un aceite, comprendiendo el método elaborar una biomasa según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y obtener el aceite de la biomasa.

20 6. El método según la reivindicación 5, en el que el aceite se extrae de la biomasa.

7. El método según la reivindicación 6, en el que la biomasa se produce a partir de un microorganismo aislado depositado bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-10208, en donde el aceite comprende ácidos grasos, en donde los ácidos grasos comprenden además ácidos grasos poliinsaturados omega-3, en donde los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 comprenden DHA y EPA en una cantidad de alrededor de ≥90%, en peso, de la cantidad total de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y la cantidad de EPA, en peso, es de alrededor de 6% hasta alrededor de 65% de la cantidad total de EPA y DHA.

30 8. El método según la reivindicación 7, en el que:

(a) la cantidad de EPA, en peso, es de alrededor de 6% hasta alrededor de 28% de la cantidad total de EPA y DHA;

(b) la cantidad de EPA, en peso, es de alrededor de 36% hasta alrededor de 65 de la cantidad total del EPA y el DHA; o

35 (c) la cantidad de EPA, en peso, es de alrededor de 28% a alrededor de 36% de la cantidad total de EPA y DHA.

9. El método según la reivindicación 6, en el que la biomasa se produce a partir de un microorganismo aislado depositado bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-10212, en donde el aceite comprende ácidos grasos, en donde los ácidos grasos comprenden además DHA y EPA y la cantidad de EPA, en peso, es de alrededor de 15 hasta alrededor de 70% del peso total de EPA y DHA.

10. El método según la reivindicación 6, en el que la biomasa se produce a partir de un microorganismo aislado depositado bajo el N° de Registro de la ATCC PTA-9695, en donde el aceite comprende ácidos grasos, en donde los ácidos grasos comprenden además ácidos grasos poliinsaturados omega-3, en donde los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 comprenden DHA y EPA en una cantidad de alrededor de 50 a alrededor de 70%, en peso, de la cantidad total de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y la cantidad de EPA, en peso, es de alrededor de 5% hasta alrededor de 60% de la cantidad total del peso total del EPA y el DHA, preferiblemente en donde el DHA y el EPA está en una cantidad de alrededor de 60% de la cantidad total de los ácidos grasos omega-3.

11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, en el que se obtiene un aceite crudo y en el que el procedimiento comprende además purificar el aceite crudo.

