

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 199 946**

51 Int. Cl.:

**A23L 1/00** (2006.01)

**C12P 7/64** (2006.01)

**C12N 1/00** (2006.01)

**C12N 1/10** (2006.01)

**C12N 1/12** (2006.01)

**C12N 5/00** (2006.01)

**A23L 1/03** (2006.01)

**C12N 1/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

96 Número de solicitud europea: **93923347 .4**

96 Fecha de presentación: **12.10.1993**

97 Número de publicación de la solicitud: **0669809**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.09.1995**

54

Título: **Procedimiento para la producción heterótrofa de productos microbianos con grandes concentraciones de ácidos grasos omega-3 muy insaturados**

30

Prioridad:  
**16.10.1992 US 962522**

45

Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **01.03.2004**

45

Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **07.09.2012**

45

Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **07.09.2012**

73

Titular/es:  
**MARTEK BIOSCIENCES CORPORATION  
6480 DOBBIN ROAD  
COLUMBIA, MD 21045, US**

72

Inventor/es:  
**BARCLAY, William R.**

74

Agente/Representante:  
**Curell Aguilá, Mireia**

ES 2 199 946 T5

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la producción heterótrofa de productos microbianos con grandes concentraciones de ácidos grasos omega-3 muy insaturados.

5

**Campo de la invención**

El campo de la presente invención se refiere a un procedimiento para cultivar organismos heterótrofos para la producción de lípidos con grandes concentraciones de ácidos grasos omega-3 muy insaturados (HUFA) adecuados para consumo humano y animal como aditivos de alimentación o para utilización en productos farmacéuticos e industriales.

10

**Antecedentes de la invención**

Los ácidos grasos omega-3 muy insaturados (HUFA) son de interés comercial significativo porque han sido reconocidos recientemente como importantes compuestos dietéticos para prevenir la arteriosclerosis y las enfermedades coronarias, para aliviar las enfermedades inflamatorias y para retardar el crecimiento de las células tumorales. Estos efectos beneficiosos son resultado tanto de los HUFA omega-3 que producen inhibición competitiva de compuestos producidos a partir de ácidos grasos omega-6 y a partir de compuestos beneficiosos producidos directamente a partir de los propios HUFA omega-3 (Simopoulos *et al.*, 1986). Los ácidos grasos omega-6 son los HUFA predominantes hallados en vegetales o animales. Actualmente, existe una fuente dietética disponible en el comercio de HUFA omega-3 en determinados aceites de pescado que pueden contener hasta el 20 al 30% de estos ácidos grasos. Los efectos beneficiosos de estos ácidos grasos se pueden obtener comiendo pescado varias veces a la semana o tomando diariamente aceite concentrado de pescado. Por consiguiente grandes cantidades de aceite de pescado se procesan y se encapsulan cada año para venderlo como complemento dietético. Sin embargo, existen varios problemas significativos con estos complementos de aceite de pescado, que incluyen la bioacumulación de vitaminas liposolubles y grandes concentraciones de ácidos grasos saturados y omega-6, los cuales pueden tener efectos perjudiciales para la salud.

15

20

25

30

35

Otra fuente de HUFA omega-3 es la microclora *Thraustochytrium* y *Schizochytrium* que se tratan con detalle en la patente U.S. nº 5.130.242 relacionada. Esta microflora presenta las ventajas de ser heterótrofa y capaz de altos niveles de producción de HUFA omega-3. Kendrick *et al.* (1992) *Lipids* 27(1), 15-19 muestra un procedimiento de cultivo de *Thraustochytrium* spp. en un medio que contiene Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Existe todavía la necesidad sin embargo de mejorar los procedimientos de fermentación de esta microflora y de identificación de utilidades mejoradas del producto de la microflora.

**Breve resumen de la invención**

Según la presente invención se proporciona un procedimiento para el desarrollo de *Thraustochytrium*, *Schizochytrium* y/o mezclas de las mismas, que comprende el cultivo de dichas *Thraustochytrium*, *Schizochytrium* y/o mezclas de las mismas, en un medio de cultivo que contiene sulfato de sodio y que presenta menos de 120 miligramos de cloruro por litro de dicho medio de cultivo.

40

45

50

Por lo tanto, la presente invención se refiere a nuevos procedimientos para desarrollar la microflora de *Thraustochytrium*, *Schizochytrium* y/o mezclas de las mismas, en un medio de cultivo que contiene sulfato de sodio. Más particularmente, una parte significativa de los requisitos de sodio de la fermentación se suministra como sulfato de sodio. El presente procedimiento sirve particularmente para la producción comercial porque el contenido en cloruro en el medio se puede reducir significativamente, evitando de este modo los efectos corrosivos del cloruro en el equipo de fermentación. Además, la presente invención es especialmente útil para la producción de productos alimenticios para utilización en acuicultura debido a que *Thraustochytrium* y *Schizochytrium* cultivadas en tal medio forman grupos mucho más pequeños que las cultivadas en un medio con muchos cloruros y por lo tanto están más disponibles como fuente de alimentación para larvas de gambas. En particular, *Thraustochytrium* y *Schizochytrium* cultivadas en un medio que contiene sulfato de sodio pueden tener agregados de células de un tamaño medio menor de 150 µm (150 micras) de diámetro.

55

Se describe la producción de una biomasa de microflora que comprende *Thraustochytrium*, *Schizochytrium* y mezclas de las mismas que tienen un tamaño medio del agregado celular menor de 150 µm (150 micras).

60

65

La biomasa de microflora sirve para acuicultura y en especial, para alimentar larvas de gambas debido a que la microflora presenta las principales ventajas del alimento necesitado por las gambas de un gran contenido en esteroles y un gran contenido en ácido graso muy insaturado omega-3 (HUFA). Además, debido al pequeño tamaño del agregado celular, la larva de gamba, gamba de salmuera, rotíferos y moluscos pueden alimentarse de microflora. La presente invención comprende además un procedimiento para la producción de estos organismos que comprende la alimentación de *Thraustochytrium*, *Schizochytrium* y mezclas de las mismas, el crecimiento según la presente invención con un tamaño celular medio menor de 150 µm (150 micras) en ellas.

Se describe un producto alimenticio que está compuesto por microflora seleccionado de entre el grupo constituido por *Thraustochytrium*, *Schizochytrium* y mezclas de las mismas, el desarrollo según la presente invención y un componente adicional seleccionado de entre el grupo constituido por linaza, rabeña, soja, harina de aguacate y mezclas de las mismas. Una ventaja particular de este producto alimenticio es que tiene un gran contenido en ácido graso omega-3 de cadena larga y un gran contenido de ácido graso omega-3 de cadena corta del componente adicional. En una forma de realización adicional, el producto alimenticio se produce por extrusión. El procedimiento de extrusión comprende mezclar la microflora con el componente adicional, reduciendo de este modo el contenido de humedad del producto alimenticio. El producto alimenticio se extruye a continuación con calor, eliminando de este modo una parte importante de la humedad reducida. La cantidad restante del contenido original de humedad se elimina fácilmente mediante secado con aire o cortos periodos de secado en estufa, reduciendo de este modo los requisitos de energía total de secado y la degradación potencial de los HUFA omega-3 mediante secado prolongado a altas temperaturas.

### Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 es una representación gráfica de la producción de HUFA en cepas recién aisladas útiles en la invención, representadas por ■ y cepas aisladas anteriormente representadas por +. Cada punto representa una cepa, la posición de cada punto se determina mediante el porcentaje en peso de los ácidos grasos totales que eran HUFA omega-3 (abscisas) y el porcentaje en peso de los ácidos grasos totales que eran ácidos grasos omega-6 (ordenadas). Solamente se representaron aquellas cepas de la invención en las que menos del 10,6% (p/p) de los ácidos grasos totales eran omega-6 y más del 67% de los ácidos grasos totales eran omega-3.

La Fig. 2 es una representación gráfica de la producción de HUFA en cepas recién aisladas útiles en la invención, representadas por ■ y cepas aisladas anteriormente, representadas por +. Cada punto representa una cepa, la posición de cada punto se determina mediante el porcentaje en peso de los ácidos grasos totales que eran HUFA omega-3 (abscisas) y el porcentaje en peso de los ácidos grasos totales que eran ácido eicosapentanoico (EPA C20:5n-3) (ordenadas). Solamente se representaron las cepas de la invención en las que más del 67% de los ácidos grasos totales eran omega-3 y más del 7,8% (p/p) de los ácidos grasos totales eran C20:5n-3.

La Fig. 3 es una representación gráfica de la composición de HUFA omega-3 en cepas recién aisladas útiles en la invención, representadas por □ y cepas aisladas anteriormente, representadas por +. Cada punto representa una cepa por separado. Los valores de las abscisas son fracciones en peso de las HUFA omega-3 totales que eran C20:5n-3 y en ordenadas están las fracciones en peso de los ácidos grasos omega-3 totales muy insaturados que eran C22:6n-3. Solamente se representaron las cepas de la invención que tienen una fracción en peso de 28% de C20:5n-3 ó mayor o una fracción en peso de C22:6n-3 mayor del 93,6%.

La Fig. 4 es un gráfico que muestra el desarrollo de varias cepas útiles en la invención recién aisladas y de cepas aisladas anteriormente, a 25°C y a 30°C. Las velocidades de crecimiento están normalizadas para la velocidad de crecimiento de la cepa U-30 a 25°C. Anteriormente las cepas aisladas se denominaron según sus números de acceso a ATCC.

La Fig. 5 es un gráfico de los rendimientos totales de la producción celular después de la inducción por limitación de nitrógeno. Se representó cada uno de los pesos en seco sin cenizas, de los ácidos grasos totales y de los HUFA omega-3, indicados, normalizados al correspondiente valor para la cepa 28211. Todas las cepas se identifican mediante números de acceso a ATCC.

La Fig. 6 es un gráfico de rendimientos de ácidos grasos después del crecimiento en medios de cultivo que tiene la salinidad indicada en abscisas. Las cepas mostradas son cepas S31 recién aisladas (ATCC 20888) (□) y U42-2 (ATCC 20891) (+) y cepas aisladas anteriormente, ATCC 28211 (◇) y ATCC 28209 (Δ). Los rendimientos en ácido graso se representan como rendimientos normalizados correspondientes a un valor arbitrario de 1,00 basados en la velocidad media de crecimiento presentada por S31 (ATCC 20888) (□) en todo el intervalo de salinidad probado.

La Fig. 7 es un gráfico de aumentos en el contenido de HUFA omega-3 de los lípidos totales en la gamba de salmuera, *Artemia salina*, cepa de *Thraustochytrium* alimentada (ATCC 20890) aislada por el procedimiento del Ejemplo 1. EPA = C20:5n-3; DHA = C22:5n-3.

La Fig. 8 es un gráfico de aumentos en el contenido de HUFA omega-3 de los lípidos totales en la gamba de salmuera, *Artemia salina*, cepa de *Thraustochytrium* alimentada (ATCC 20888) aislada por el procedimiento del Ejemplo 1. EPA = C20:5n-3; DHA = C22:5n-3.

### Descripción detallada de las formas de realización preferidas

Con fines de definición en toda la solicitud, se entiende en la presente memoria que un ácido graso es un ácido monocarboxílico alifático. Se entiende que los lípidos son grasas o aceites que incluyen los ésteres de glicérido de ácidos grasos junto con fosfátidos, esteroides, alcoholes, hidrocarburos, cetonas asociados y compuestos relacionados. En la presente memoria se utiliza un sistema taquigráfico empleado corrientemente para indicar la

estructura de los ácidos grasos (p. ej.: Weete, 1980). Este sistema utiliza la letra "C" acompañada de un número que indica el número de carbonos en la cadena de hidrocarburo, seguida de dos puntos y un número que indica el número de dobles enlaces, es decir, C20:5, ácido eicosapentanoico. Los ácidos grasos se numeran empezando en el carbono carboxi. La posición de los dobles enlaces se indica añadiendo la letra griega delta ( $\Delta$ ) seguida del número de carbono del doble enlace; es decir, C20:5 omega-3 $\Delta^{5,8,11,14,17}$ . La notación "omega" es un sistema taquigráfico para los ácidos grasos insaturados según la cual se utiliza la numeración a partir del carbono carboxi-terminal. Por comodidad, n-3 se utilizará para simbolizar "omega-3" especialmente al utilizar la nomenclatura taquigráfica numérica descrita en la presente memoria. Se entiende que los ácidos grasos omega-3 muy insaturados son ácidos grasos polietilénicos y que el último enlace etilénico es a partir del carbono 3 e incluye el grupo metil terminal del ácido graso. Por lo tanto, la nomenclatura completa para el ácido eicosapentanoico, ácido graso omega-3 muy insaturado sería C20:5n-3 $\Delta^{5,8,11,14,17}$ . Por motivo de brevedad, se omitirán las posiciones del doble enlace ( $\Delta^{5,8,11,14,17}$ ). El ácido eicosapentanoico se denomina entonces C20:5n-3, el ácido docosapentanoico (C22:5n-3 $\Delta^{7,10,13,16,19}$ ) es C22:5n-3 y el ácido docosahexanoico (C22:6n-3 $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$ ) es C22:6n-3. La nomenclatura "ácido graso muy insaturado" significa un ácido graso con 4 ó más dobles enlaces. "Ácido graso poliinsaturado" significa un ácido graso con 1 a 3 dobles enlaces.

Se ha desarrollado un procedimiento de recogida e identificación para aislar fácilmente muchas cepas de microorganismos con la siguiente combinación de características económicamente deseables para la producción de HUFA omega-3: 1) capaz de crecimiento heterótrofo; 2) gran contenido en HUFA omega-3; 3) unicelular; 4) preferentemente con bajo contenido en HUFA saturados y omega-6; 5) preferentemente células no pigmentadas blancas o esencialmente incoloras; 6) preferentemente termotolerantes (capacidad de crecer a temperaturas por encima de 30°C); y 7) preferentemente eurihalinas (capaces de crecer en todo un amplio intervalo de salinidades, pero especialmente a bajas salinidades). Este procedimiento se describe con detalle en la citada patente U.S. nº 5.130.242.

Utilizando el procedimiento de recogida e identificación, se pueden aislar cepas unicelulares de microflora que tienen contenidos de ácidos grasos hasta aproximadamente un porcentaje en peso en seco celular total del 45% (%p. en seco) y que presentan crecimiento en todo un intervalo de temperatura desde 15 a 48°C y crecen en un medio de cultivo de muy baja salinidad. Muchas de las cepas con muchos omegas-3 son de crecimiento muy lento. Las cepas que se han aislado por el procedimiento indicado anteriormente y que presentan rápido crecimiento, buena producción y alto contenido en HUFA omega-3, tienen contenidos en ácidos grasos insaturados omega-3 hasta aproximadamente el 12% en peso en seco.

La presente invención proporciona el cultivo de *Thraustochytrium*, *Schizochytrium* y mezclas de las mismas con gran contenido en HUFA omega-3, en un medio de fermentación que contiene sulfato de sodio. Más particularmente, una parte importante de las necesidades de sodio de la fermentación se suministran como sulfato de sodio. Por ejemplo, menos del 75% del sodio en el medio de fermentación se suministra como cloruro de sodio, más preferentemente menos del 50% y más preferentemente menos del 25%. Una ventaja particular de la presente invención es que el medio proporciona la fuente de sodio que necesita la microflora para crecer en ausencia de una cantidad importante de cloruro que puede corroer el vaso en el que se está desarrollando la microflora y otra fermentación o el equipo del tratamiento corriente abajo. Se ha observado sorprendentemente que la microflora de la presente invención se puede desarrollar en concentraciones de cloruro menores de 120 mg/l, preferentemente entre 60 mg/l y 120 mg/l aunque todavía se alcanzan altas concentraciones de biomasa para azúcar del 50% o mayores. Como se trata más adelante, una ventaja adicional de la presente invención es la producción de microflora que tienen alto contenido en HUFA omega-3 pero tienen un tamaño de agregado celular bastante pequeño para ser consumido por la larva de gamba, la gamba de salmuera, rotíferos y moluscos.

La concentración de sulfato de sodio es eficaz para satisfacer los requisitos de salinidad de la microflora, preferentemente la concentración de sodio (expresada como g/l de Na) es mayor de 1,0 g/l, más preferentemente entre 1,0 g/l y 50,0 g/l y más preferentemente entre 2,0 g/l y 25 g/l.

Se ha observado sorprendentemente que la fermentación de las cepas en presencia de sulfato de sodio limita el tamaño del agregado celular de las cepas menores de 150  $\mu\text{m}$  (150 micras), preferentemente menos de 100  $\mu\text{m}$  (100 micras) y más preferentemente menos de 50  $\mu\text{m}$  (50 micras). Según se utiliza en la presente memoria, el término tamaño del agregado celular se refiere al diámetro medio aproximado de los grupos o agregados de células en un medio de fermentación de un cultivo microfloral. Típicamente, más del 25% de los agregados celulares en un cultivo microfloral tienen el tamaño del agregado celular inferior al tamaño medio, más preferentemente más del 50 por ciento y más preferentemente más del 75 por ciento. Las células de microflora producidas según la presente invención satisfacen los parámetros del tamaño del agregado celular descritos anteriormente tanto en el medio de fermentación como después de la congelación y/o secado de la biomasa si se vuelve a poner en suspensión en el líquido o se agita físicamente, tal como con un mezclador o un agitador de vórtice. El presente procedimiento es especialmente importante para la microflora que se replica por bipartición sucesiva (en la que una sola célula se replica dividiéndose en dos células, cada una de las cuales se divide en dos más, etc.) debido a que como las células experimentan repetida y rápidamente este proceso, las células tienden a agruparse formando agregados multicelulares que con frecuencia están fuera de los parámetros del tamaño del agregado celular identificados

anteriormente. *Schizochytrium* se replican por bipartición sucesiva y formando esporangios que liberan zoosporas. *Thraustochytrium*, sin embargo, se replican solamente formando esporangios y liberando zoosporas. Para *Thraustochytrium* que se replican por formación de esporangios/zoosporas, el agrupamiento puede ser también un problema, particularmente debido a que incluso la totalidad del número de células de un agregado puede no ser tan grande como los agregados formados por bipartición sucesiva, los tamaños celulares individuales de *Thraustochytrium* tienden a ser mayores, y por lo tanto, los grupos de número de células pequeño son mayores. Sin embargo, se ha identificado una cepa depositada de *Thraustochytrium*, ATCC 26185, que no presenta agregación significativa.

En una forma de realización de la presente invención, se ha descubierto que limitando el contenido de oxígeno del medio de fermentación durante el cultivo de *Thraustochytrium*, *Schizochytrium* y mezclas de las mismas, el contenido en lípidos de las cepas se puede aumentar. La concentración óptima de oxígeno para la producción de lípidos se puede determinar en cualquier microflora particular variando el contenido de oxígeno del medio. En particular, el contenido de oxígeno del medio de fermentación se mantiene en un contenido en oxígeno menor del 40% de saturación y preferentemente entre el 5% de saturación y el 40% de saturación.

El cultivo de las cepas mediante el procedimiento de la invención se puede efectuar a cualquier temperatura que conduzca al cultivo satisfactorio de las cepas; por ejemplo, entre 5°C y 48°C, preferentemente entre 15°C y 40°C y más preferentemente entre 25°C y 35°C. El medio de cultivo se hace típicamente más alcalino durante la fermentación si el pH no está controlado por la adición de ácido o tampones. Las cepas crecerán en todo el intervalo de pH desde 5,0 a 11,0 con un intervalo preferente de 6,0 a 8,5.

En la patente U.S. nº 5.130.242 se tratan con detalle varios parámetros de la fermentación para inocular, cultivar y recuperar la microflora. La biomasa recogida de una etapa de fermentación se puede secar (p. ej.: secado por pulverización, secado en túnel, secado al vacío o por un procedimiento similar) y se utiliza como alimento o complemento alimenticio para cualquier animal cuya carne o productos consuman los seres humanos. De forma parecida, los HUFA omega-3 extraídos se pueden utilizar como alimento o como complemento alimenticio. Alternativamente, la biomasa recogida y lavada se puede utilizar directamente (sin secado) como complemento alimenticio. Para prolongar su periodo de conservación, la biomasa húmeda se puede acidificar (pH aproximado = 3,5-4,5) y/o pasteurizar o calentar por expansión para inactivar los enzimas y a continuación enlatar, embotellar o empaquetar al vacío o en atmósfera no oxidante (p. ej.: N<sub>2</sub> ó CO<sub>2</sub>). El término "animal" significa cualquier organismo perteneciente al reino Animal e incluye, sin limitación, cualquier animal del que se obtienen carne de aves de corral, alimentos marinos, carne de vaca, de cerdo o de cordero. Los alimentos marinos proceden, sin limitación, de peces, gambas y crustáceos. El término "productos", comprende cualquier otro producto distinto de la carne procedente de tales animales, incluyendo, sin limitación, huevos u otros productos. Cuando se alimenta a tales animales, los HUFA omega-3 en la biomasa recogida o los HUFA omega-3 extraídos se incorporan en la carne, los huevos u otros productos de tales animales para aumentar el contenido en HUFA omega-3 de éstos.

Se describe asimismo la utilización de la biomasa recogida como producto alimenticio para larvas de gambas, gambas de salmuera, rotíferos y moluscos y en especial, larvas de gambas. Durante la etapa de crecimiento de larva, las larvas de gamba no pueden utilizar ninguna fuente de alimentación porque la fuente de alimentación es demasiado grande. En particular, en determinadas etapas del desarrollo, las larvas de gamba no pueden utilizar una fuente de alimentación que tenga un diámetro mayor de 150 µm (150 micras). Por lo tanto, el cultivo de la microflora en el medio de fermentación que contiene una sal de sodio sin cloruro, y particularmente sulfato de sodio, como se trató antes extensamente, son adecuadas para utilizar como producto alimenticio para gambas. Como se discutió anteriormente el cultivo de la microflora en tales condiciones típicamente tiene un tamaño de agregado celular inferior a 150 µm (150 micras), preferentemente menor de 100 µm (100 micras) y más preferentemente menor de 50 µm (50 micras).

Una ventaja adicional de la utilización de microflora que puede producirse mediante la presente invención como fuente alimenticia para gambas es que dicha microflora tenga un contenido en esterol importante incluyendo colesterol, que es un requisito alimenticio principal para las gambas. La microflora que puede obtenerse utilizando la presente invención típicamente tiene un contenido en esterol preferentemente de por lo menos 0,1% en peso en seco sin cenizas (afdwt), más preferentemente de por lo menos 0,5% afdwt, y aún más preferentemente de por lo menos 1,0% afdwt. Además, la microflora que puede obtenerse utilizando la presente invención típicamente tiene un contenido en colesterol de preferentemente por lo menos 15% del contenido de esterol total más preferentemente de por lo menos 25 % y aún más preferentemente por lo menos 40% del contenido de esterol total. Además, la biomasa de microflora que puede obtenerse utilizando la presente invención proporciona asimismo gambas con requisitos nutritivos adicionales tales como ácidos grasos omega-6, proteínas, carbohidratos, pigmentos y vitaminas.

El producto microbiano que puede obtenerse utilizando la presente invención es de valor como fuente de HUFA omega-3 para peces, gambas y otros productos producidos mediante acuicultura. El producto se puede utilizar como producto alimenticio descrito anteriormente para gambas; o añadir directamente como complemento en la alimentación de gambas y peces, generalmente; o se puede alimentar a gambas de salmuera u otros organismos con alimentos vivos destinados al consumo para un organismo desarrollado por acuicultura. La utilización de tal microflora permite de esta manera al acuicultor de gambas obtener velocidades de crecimiento significativamente

mayores y/o índices de supervivencia para las larvas de gambas y producir gambas en estado post-larvario que son mucho más resistentes y robustas.

5 Para la mayoría de las aplicaciones de alimentación, el contenido en ácido graso de las células recogidas será aproximadamente del 15 al 50% en peso en seco, siendo el material restante en su mayoría proteínas y carbohidratos. La proteína puede contribuir significativamente al valor nutritivo de las células como varias de las cepas que se han evaluado que tienen todas aminoácidos esenciales y se considerarían una proteína nutricionalmente equilibrada.

10 Se describe asimismo la producción de un producto alimenticio utilizando *Thraustochytrium*, *Schizochytrium* y mezclas de las mismas, de la presente invención, combinadas con un componente adicional seleccionado de entre el grupo constituido por rabeña, linaza, soja y harina de aguacate. Una ventaja particular de esto es que el producto alimenticio contiene tanto HUFA omega-3 de cadena corta procedente del componente adicional como HUFA omega-3 de cadena larga procedente de la microflora. Los productos alimenticios que tienen linaza, rabeña, soja y  
15 harina de aguacate se conocen porque sirven para aportar una fuente de HUFA omega-3 de cadena corta y para aportar adicionalmente una fuente de HUFA omega-3 de cadena corta, que se puede extender a los seres humanos y a los animales que las ingieren. Tales productos alimenticios, sin embargo, poseen las desventajas de tener altos contenidos en colina procedentes del componente adicional, que pueden formar aminas primarias y producen un olor a pescado desagradable; y compuestos tóxicos procedente del componente adicional, que en grandes  
20 concentraciones pueden, por ejemplo, inhibir la puesta de huevos por las gallinas o producir que los animales pierdan el gusto por su alimento. Como tal, el producto alimenticio de la presente invención tiene la ventaja de un contenido reducido en linaza, rabeña, soja o harina de aguacate porque el organismo que ingiere el producto alimenticio no necesita grandes cantidades de HUFA omega-3 de cadena corta con el fin de transformarlos en HUFA de cadena larga. Por lo tanto, el contenido reducido en linaza y rabeña del producto alimenticio produce menores  
25 cantidades de colina y/o de compuestos tóxicos inhibidores presentes en el producto alimenticio.

La cantidad de *Thraustochytrium*, *Schizochytrium* y mezclas de las mismas, utilizadas en el producto alimenticio puede variar entre el 5% y el 95% en peso. El componente adicional puede estar presente en el producto alimenticio en un intervalo entre el 5% al 95% en peso. Adicionalmente, el producto alimenticio puede incluir también otros  
30 componentes, incluyendo granos, complementos, vitaminas, aglutinantes y conservantes.

El producto alimenticio anterior puede ser producido utilizando un procedimiento de extrusión. El procedimiento de extrusión implica la mezcla de la microflora con el componente adicional, reduciendo de este modo la humedad en la biomasa de la microflora mediante la cantidad del componente adicional mezclado. El producto alimenticio se  
35 extruye con calor, eliminando de este modo la humedad adicional del producto alimenticio. El producto resultante que tiene un contenido bajo en humedad se puede secar al aire o secar por periodos en la estufa relativamente cortos reduciendo de este modo los requisitos de energía total de secado y la degradación potencial de los HUFA omega-3 debido a periodos de tiempo prolongados a altas temperaturas. Además, el calor del procedimiento de extrusión puede degradar alguno de los componentes tóxicos indeseables hallados generalmente en el componente  
40 adicional que puede, por ejemplo, inhibir la puesta de huevos por las gallinas o producir que los animales pierdan el gusto por su alimento.

La presente invención se describirá con más detalle por medio de ejemplos prácticos. Las especies que satisfacen los criterios de selección descritos anteriormente no han sido descritas en la técnica anterior. Empleando estos  
45 criterios de selección, se han aislado más de 25 cepas potencialmente prometedoras de aproximadamente 1000 muestras identificadas. Fuera de las aproximadas 20.500 cepas en la *American Type Culture Collection* (ATCC), se identificaron posteriormente 10 cepas que pertenecen al mismo grupo taxonómico que las cepas aisladas. Se obtuvieron cepas todavía viables de la *Collection* y se utilizaron para comparar con las cepas aisladas y cultivadas por los procedimientos expuestos. Los resultados de esta comparación se presentan en los Ejemplos 4 y 5 más  
50 adelante.

Los teóricos taxonómicos más recientes sitúan a los Traustoquídridos con las algas o con los protistas de tipo alga. Todas las cepas de los microorganismos unicelulares dadas a conocer y reivindicadas en la presente memoria son elementos del orden Traustoquitriales (Orden: Traustoquitriales; familia: Traustoquitriáceas; Género: *Thraustochytrium* o *Schizochytrium*). Para los fines generales de discusión en la presente memoria, estos  
55 microorganismos se denominarán microflora para indicar mejor su exacta posición taxonómica indeterminada.

Las nuevas cepas identificadas a continuación se depositaron bajo el tratado de Budapest sobre Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos con objeto del procedimiento de la patente.  
60

Los microorganismos preferidos utilizados en la presente invención poseen todas características identificadoras de las cepas depositadas y, en particular, las características identificadoras de ser capaces de producir los HUFA omega-3 descritos en la presente memoria y poseyendo características de tamaño de agregado celular cuando se cultivan en condiciones como las descritas en la presente memoria. En particular, los microorganismos preferidos de la presente invención se refieren a los siguientes microorganismos depositados y a sus mutantes.  
65

Cepa	ATCC nº	Fecha de depósito
<i>Schizochytrium</i> S31	20888	8/8/88
<i>Schizochytrium</i> S8	20889	8/8/88

La presente invención, en tanto se expone desde el punto de vista de las cepas del organismo específico, está destinada a incluir todos los procedimientos y cepas obtenibles y útiles según las enseñanzas dadas a conocer en la presente memoria, incluyendo tales sustituciones, modificaciones y optimizaciones que serían expedientes disponibles para los expertos destacados en la materia.

Los siguientes ejemplos y resultados de la prueba se proporcionan con fines de ilustración y no pretenden limitar el alcance de la invención (Ejemplos 1 a 12 son Ejemplos preparativos).

## 10 Ejemplos

### Ejemplo 1. Recogida e identificación

Se recogió una muestra de agua de 150 ml de un estanque salino interior, poco profundo y se almacenó en una botella de polietileno estéril. Se procuró incluir alguno de los materiales vegetales vivos y de los detritus naturales (materia vegetal y animal podrida) junto con la muestra de agua. Se colocó la muestra en hielo hasta regresar al laboratorio. En el laboratorio, se agitó la muestra de agua durante 15 a 30 segundos y se pipeteó 1 a 10 ml de la muestra o se vertió en una unidad filtrante conteniendo 2 tipos de filtros: 1) en la parte superior, un filtro de Whatman nº 4 estéril de 47 mm de diámetro con un tamaño de poro aproximadamente de 25 µm; y 2) debajo del filtro de Whatman, un filtro de policarbonato de 47 mm de diámetro con aproximadamente un tamaño de poro de 1,0 µm. Dadas las ligeras variaciones de los tamaños nominales de poro para los filtros, las células recogidas en el filtro de policarbonato varían en tamaño desde aproximadamente 1,0 µm hasta aproximadamente 25 µm.

Se retiró el filtro de Whatman y se descargó. El filtro de policarbonato se colocó en un medio sólido F-1 en una placa de Petri, consistiendo dicho medio (por litro) en: 600 ml de agua de mar ( se puede utilizar agua de mar artificial), 400 ml de agua destilada, 10 g de agar, 1 g de glucosa, 1 g de hidrolizado de proteínas, 0,2 g de extracto de levadura, 2 ml de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M, 1 ml de una solución de vitaminas (vitaminas A) (conteniendo 100 mg/l de tiamina, 0,5 mg/l de biotina y 0,5 mg/l de cianocobalamina), 5 ml de una mezcla de metales en trazas (metales PII, conteniendo por litro: 6,0 g de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 0,29 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 6,84 g de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0,86 g de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,06 g de  $\text{ZnCl}_2$ , 0,026 g de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,052 g de  $\text{NiSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,002 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y 0,005 g de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y 500 mg de sulfato de estreptomycin y 500 mg de penicilina-G. La placa de agar se incubó en la oscuridad a 30°C. Después de 2 a 4 días aparecieron numerosas colonias sobre el filtro. Las colonias de microflora unicelular (excepto levadura) se seleccionaron de la placa y se rayaron en una nueva placa de composición similar media. Se puso especial atención en seleccionar todas las colonias constituidas por células blancas incoloras. Se incubó la nueva placa a 30°C y se seleccionaron colonias individuales después de un periodo de incubación de 2 a 4 días. Las colonias individuales se seleccionaron a continuación y se colocaron en 50 ml de un medio líquido que contenía las mismas fertilizaciones orgánicas que en las placas de agar. Estos cultivos se incubaron durante 2 a 4 días a 30°C en una mesa con agitador rotatorio (100 a 200 rpm). Cuando pareció que los cultivos alcanzaban la máxima densidad, se recogió 20 a 40 ml de cultivo, se centrifugó y se liofilizó. A continuación se analizó la muestra mediante técnicas cromatográficas estándar bien conocidas (p. ej.: Lepage y Roy, 1984) para identificar el contenido en ácido graso de la cepa. Se identificaron de este modo las cepas con HUFA omega-3, y los cultivos de estas cepas se conservaron para identificación posterior.

Utilizando el procedimiento de recogida e identificación indicado anteriormente, se han aislado más de 150 cepas de microflora unicelular que tienen altos contenidos de HUFA omega-3 como porcentaje de los ácidos grasos totales y que presentan crecimiento en todo un intervalo de temperatura de 15 a 48°C. Las cepas que tienen menos del 1% (como % de ácidos grasos totales) también se pueden aislar de los HUFA C20:4n-6 y C22:5n-6 indeseables para algunas aplicaciones. Las cepas con alto contenido en omega-6 se pueden asimismo aislar. Las cepas de estas microfloras se pueden aislar repetidamente desde la misma posición utilizando el procedimiento señalado anteriormente. Pocas cepas recién aisladas tienen perfiles de ácido graso muy similares. La posibilidad de que algunas sean cepas duplicadas de la misma cepa no se puede regular actualmente. La identificación adicional para otros rasgos deseables tal como tolerancia a la salinidad o capacidad para utilizar una variedad de fuentes de carbono y de nitrógeno se puede realizar a continuación utilizando un procedimiento similar.

### 55 Ejemplo de referencia 2. Mantenimiento de crecimiento no limitado: Extracto de $\text{PO}_4$ y levadura

Se seleccionaron células de *Schizochytrium aggregatum* (ATCC 28209) del medio sólido F-1 y se inocularon en 50 ml de medio FFM (Fuller *et al.*, 1964). Este medio contiene: agua de mar, 1000 ml; glucosa, 1,0 g; hidrolizado de gelatina, 1,0 g; extracto de hígado, 0,01 g; extracto de levadura, 0,1 g; metales PII, 5 ml; solución de vitaminas B, 1 ml (Goldstein *et al.*, 1969); y 1 ml de una solución de antibióticos (25 g/l de sulfato de estreptomycin y penicilina G). 1,0 ml de la mezcla de vitaminas (pH 7,2) contiene: tiamina HCl, 200 µg; biotina, 0,5 µg; cianocobalamina, 0,05 µg; ácido nicotínico, 100 µg; pantotenato de calcio, 100 µg; riboflavina, 5,0 µg; pirodoxina HCl, 40,0 µg; pirodoxamina 2 HCl, 20,0 µg; ácido p-aminobenzoico, 10 µg; cloro HCl, 500 µg; inositol, 1,0 mg; timina, 0,8 mg;

ácido orótico, 0,26 mg; ácido folínico, 0,2 µg y ácido fólico, 2,5 µg. El cultivo se colocó en un agitador rotatorio (200 rpm) a 27°C. Después de 3 a 4 días, se transfirió 1 ml de este cultivo a 50 ml de cada uno de los tratamientos siguientes: 1) medio FFM (como referencia); y 2) medio FFM con la adición de 250 mg/l de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 250 mg/l de extracto de levadura. Estos cultivos se colocaron en un agitador rotatorio (200 rpm) a 27°C durante 48 h. Las células se recogieron y se cuantificó el rendimiento en células. En el tratamiento 1, la concentración final de células sobre la base de peso en seco sin cenizas fue de 616 mg/l. En el tratamiento 2, la concentración final de las células fue de 1675 mg/l, demostrando el efecto intensificado de incrementar el  $\text{PO}_4$  y las concentraciones de extracto de levadura en el medio de cultivo.

### 10 Ejemplo de referencia 3. Mantenimiento de crecimiento no limitado: Sustitución del licor saturado de maíz por extracto de levadura

Se seleccionaron células de *Schizochytrium* sp. S31 (ATCC nº 20888) del medio sólido F-1 y se colocaron en 50 ml de medio M-5. Este medio consta de (sobre la base de un litro): extracto de levadura, 1 g; NaCl, 25 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 5 g; KCl, 1 g;  $\text{CaCl}_2$ , 200 mg; glucosa, 5 g; glutamato, 5 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g; metales PII, 5 ml; solución de vitaminas A, 1 ml y solución de antibiótico, 1 ml. Se ajustó el pH de la solución a 7,0 y la solución se filtró esterilizada. Se prepararon soluciones estériles de licor saturado de maíz (4 g/40 ml; pH 7,0) y extracto de levadura (1 g/40 ml; pH 7,0). Se añadieron a una serie de matraces con medio M-5, la siguiente cantidad de solución de extracto de levadura: 1) 2 ml; 2) 1,5 ml; 3) 1 ml; 4) 0,5 ml y 5) 0,25 ml. A otra serie de matraces con medio M-5 se añadieron extracto de levadura y soluciones de licor saturado de maíz en las siguientes cantidades: 1) 2 ml de extracto de levadura; 2) 1,5 ml de extracto de levadura y 0,5 ml de licor saturado de maíz; 3) 1 ml de extracto de levadura y 1,0 ml de licor saturado de maíz; 4) 0,5 ml de extracto de levadura y 1,5 ml de licor saturado de maíz y 5) 2 ml de licor saturado de maíz. Se utilizó un ml del cultivo en el medio F-1 para inocular cada matraz. Se colocaron en un agitador rotatorio a 27°C durante 48 h. Se recogieron las células por centrifugación y se determinó el rendimiento en células (como peso en seco sin cenizas). Los resultados se muestran en la Tabla 1. Los resultados indican que la adición de extracto de levadura hasta 0,8 g/l de medio puede aumentar el rendimiento en células. Sin embargo, la adición del licor saturado de maíz es aún más eficaz y produce el doble de rendimiento de los tratamientos con extracto de levadura añadido. Esto es muy ventajoso para la producción económica de células ya que el licor saturado de maíz es mucho menos caro que el extracto de levadura

Tabla 1

Tratamiento (Cantidad de complemento de nutriente añadido)	Peso en seco sin cenizas (mg/l)
Ext. de levadura 2,0 ml	4000
Ext. de levadura 1,5 ml	4420
Ext. de levadura 1,0 ml	4300
Ext. de levadura 0,5 ml	2780
Ext. de levadura 0,25 ml	2700
Ext. de levadura 2,0 ml	4420
Ext. de levadura 1,5 ml + CSL* 0,5 ml	6560
Ext. de levadura 1,0 ml + CSL 1,0 ml	6640
Ext. de levadura 0,5 ml + CSL 1,5 ml	7200
CSL 2,0 ml	7590

\*CSL = licor saturado de maíz

### 35 Ejemplo de referencia 4. Aumento del contenido en HUFA de las cepas aisladas por el procedimiento del Ejemplo 1 comparado con las cepas ATCC (cepas conocidas anteriormente)

Se seleccionó una batería de 151 cepas recién aisladas, según el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, se tomaron muestras de cultivo avanzado en fase exponencial y se analizó cuantitativamente el contenido en HUFA por cromatografía en gas-líquido. Todas las cepas se cultivaron en medio M1 ó en medio FFM líquido, que dieron siempre el mayor rendimiento en células. El medio M1 tiene la misma composición que el medio M5, excepto que las concentraciones en glucosa y glutamato son de 1 g/l. Además, se obtuvieron cinco especies de *Thraustochytrium* o *Schizochytrium* anteriormente aisladas procedentes de la *American Type Culture Collection*, representando todas las cepas que se obtendrían en forma viable a partir de la recogida. Estas cepas fueron: *T. aureum* (ATCC nº 28211), *T. aureum* (ATCC nº 34304), *T. roseum* (ATCC nº 28210), *T. straitum* (ATCC nº 34473) y *S. aggregatum* (ATCC nº 28209). Todas las cepas presentaron crecimiento abreviado en los medios convencionales y mostraron generalmente el mejor crecimiento en los medios de la presente invención, incluyendo el medio M5 y el medio FFM. La producción de ácido graso de cada una de las cepas conocidas se midió como se describe, basándose en el cultivo mejorado de las cepas en los medios de la invención.

Los picos de ácido graso se identificaron mediante la utilización de compuestos puros de estructura conocida. La cuantificación, desde el punto de vista del porcentaje en peso de los ácidos grasos totales, se realizó integrando los picos cromatográficos. Los compuestos identificados fueron: ácido palmítico (C16:0), C20:4n-6 y C22:1 (que el sistema empleado no resolvió por separado), C20:5n-3, C22:5n-6, C22:5n-3 y C22:6n-3. El resto, ácidos grasos de



peso molecular generalmente inferior, se incluyeron en la categoría combinada de “otros ácidos grasos”. Los ácidos grasos omega-3 se calcularon como suma de 20:5n-3, 22:5n-3 y 22:6n-3. Los ácidos grasos omega-6 totales se calcularon como suma del pico 20:4/22:1 y del pico 22:5n-6.

- 5 Los resultados se muestran en las Tablas 2 a 3 y se ilustran en las Figs. 1 a 3. De la Tabla 2 se puede apreciar que se pueden aislar un gran número de cepas por el procedimiento de la invención y que un gran número de cepas superan las cepas conocidas anteriormente por varios criterios importantes. Por ejemplo, 102 cepas produjeron por lo menos 7,8% en peso de ácidos grasos totales C20:5w3, un porcentaje mayor de este ácido graso que cualquier cepa conocida anteriormente. Las cepas 23B (ATCC nº 20892) y 12B (ATCC nº 20890) son ejemplos de tales cepas.
- 10 Treinta (30) cepas de la invención produjeron por lo menos el 68% en peso de ácidos grasos totales como ácidos grasos omega-3, más que cualquier cepa conocida anteriormente. La cepa 23B (ATCC nº 20892) es un ejemplo de tales cepas. Setenta y seis (76) cepas de la invención produjeron no más del 10% en peso de ácidos grasos totales como ácidos grasos omega-6, componentes de la dieta humana considerados indeseables, menos que cualquier cepa anteriormente conocida. Las cepas 23B (ATCC nº 20892) y 12B (ATCC nº 20890) son ejemplos de tales cepas.
- 15 Además, existen 35 cepas de la invención que producen más del 25% en peso de los ácidos grasos totales como ácidos grasos omega-6, más que cualquier cepa anteriormente conocida. Aunque tales cepas puedan tener un intervalo más estrecho de utilidades con fines dietéticos, sirven como aportes para la síntesis química de partida de eicosanoides partiendo de ácidos grasos omega-6.
- 20 Además, los datos dan a conocer muchas cepas de la invención que producen una gran proporción de ácidos grasos omega-3 totales como C22:6n-3. En la Tabla 3, se compararon 48 de las cepas mostradas en la Tabla 2, con las cepas anteriormente conocidas, mostrando cada una de C20:5n-3, C22:5n-3 y C22:6n-3 como porcentaje en peso del contenido total de omega-3. Quince cepas tuvieron por lo menos el 94% en peso de los ácidos grasos omega-3 totales como C22:6n-3, más que cualquier cepa anteriormente conocida. La cepa S8 (ATCC nº 20889) fue un ejemplo de tales cepas.
- 25 Dieciocho cepas tuvieron por lo menos el 28% en peso de los ácidos grasos omega-3 totales como C20:5n-3, más que cualquier cepa anteriormente conocida. La cepa 12B (ATCC nº 20890) fue un ejemplo de tales cepas.

30 TABLA 2 Lista de cepas y composiciones en condiciones de identificación estándar

Tanto por ciento de ácidos grasos totales							Omega 3	Omega 6	Cepa
C16:0	C20:4w6	C20:5w3	C22:5w6	C22:5w3	C22:6w3	Otro FA	Totales	Totales	
30,4%	2,8%	6,6%	3,2%	0,2%	8,3%	48,5%	15,1%	6,0%	21
22,9%	0,4%	2,3%	15,5%	0,5%	47,0%	11,5%	49,7%	15,9%	ATCC20889
14,9%	6,5%	12,0%	11,8%	0,4%	49,7%	4,7%	62,1%	18,3%	U40-2
40,3%	1,7%	3,8%	8,6%	0,0%	8,2%	37,4%	12,0%	10,2%	21B
20,7%	0,4%	7,8%	0,0%	0,0%	1,1%	70,1%	8,9%	0,4%	BG1
26,0%	5,7%	1,5%	9,7%	0,7%	9,7%	46,7%	11,9%	15,4%	56A
16,4%	1,4%	10,0%	1,9%	2,2%	46,4%	21,8%	58,6%	3,3%	11A-1
23,7%	3,3%	10,5%	1,9%	1,8%	29,9%	28,9%	42,2%	5,2%	4A-1
18,7%	6,9%	9,2%	11,9%	3,2%	25,2%	24,9%	37,5%	18,8%	17B
15,4%	4,2%	7,3%	9,5%	0,9%	51,2%	11,6%	59,3%	13,7%	ATCC20891
22,3%	3,9%	7,6%	23,5%	0,5%	22,1%	20,2%	30,2%	27,4%	S44
14,4%	2,3%	15,0%	18,4%	0,7%	43,8%	5,5%	59,4%	20,7%	U30
22,1%	7,8%	3,1%	12,7%	1,0%	14,9%	38,3%	19,0%	20,5%	59A
18,1%	2,3%	6,9%	9,1%	0,8%	52,2%	10,6%	59,9%	11,4%	U37-2
15,8%	3,9%	8,8%	11,6%	1,2%	53,3%	5,5%	63,3%	15,5%	550W
23,7%	3,8%	6,3%	6,9%	0,6%	43,0%	15,6%	50,0%	10,7%	ATCC20891
10,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	90,0%	0,0%	0,0%	UX
16,6%	6,3%	11,9%	13,3%	1,7%	43,0%	7,3%	56,6%	19,5%	LW9
17,3%	2,3%	8,4%	11,4%	0,7%	53,6%	6,5%	62,6%	13,6%	C32-2
23,8%	1,2%	6,4%	2,5%	1,9%	34,4%	29,8%	42,6%	3,7%	5A-1
17,1%	5,2%	11,1%	7,6%	2,2%	27,2%	29,6%	40,4%	12,9%	BG1
25,4%	2,2%	9,6%	7,0%	1,1%	46,0%	8,8%	56,7%	9,1%	U3
16,9%	12,0%	6,6%	16,2%	0,4%	25,1%	22,8%	32,1%	28,2%	55B
26,3%	2,6%	8,6%	2,0%	2,5%	32,4%	25,5%	43,5%	4,6%	18A
19,4%	0,3%	9,8%	0,0%	0,3%	38,4%	31,7%	48,6%	0,3%	32B
16,0%	16,7%	8,6%	18,4%	0,0%	22,5%	17,7%	31,1%	35,1%	56B
18,6%	7,7%	11,4%	3,6%	4,3%	31,7%	22,7%	47,4%	11,2%	SX2
17,8%	4,4%	16,2%	6,4%	3,7%	33,6%	17,8%	53,5%	10,9%	53B
16,8%	2,7%	13,6%	20,5%	1,4%	39,3%	5,5%	54,4%	23,3%	S49
20,8%	8,0%	8,9%	6,4%	1,7%	33,9%	20,3%	44,5%	14,4%	S3
14,8%	0,3%	3,7%	3,9%	0,0%	69,9%	7,4%	73,6%	4,2%	3A-1
28,1%	5,2%	12,7%	3,2%	0,9%	20,9%	29,0%	34,5%	8,4%	15A
20,9%	0,7%	8,5%	1,0%	0,0%	35,8%	33,0%	44,3%	1,7%	9A-1
15,7%	10,2%	8,8%	13,4%	1,5%	23,9%	26,3%	34,3%	23,7%	51B

ES 2 199 946 T5

Tanto por ciento de ácidos grasos totales							Omega 3	Omega 6	Cepa
C16:0	C20:4w6	C20:5w3	C22:5w6	C22:5w3	C22:6w3	Otro FA	Totales	Totales	
16,2%	11,2%	7,8%	16,4%	1,5%	20,4%	26,5%	29,7%	27,6%	8A-1
20,5%	5,5%	8,6%	4,8%	2,7%	28,7%	29,2%	40,0%	10,3%	13A-1
16,1%	13,6%	11,1%	16,0%	0,0%	28,4%	14,8%	39,4%	29,6%	24B-2
16,9%	7,3%	16,4%	6,1%	0,0%	40,8%	12,4%	57,2%	13,4%	24B-1
16,2%	0,0%	10,9%	1,0%	0,0%	56,5%	15,5%	67,4%	1,0%	3B
17,0%	0,0%	5,0%	2,3%	0,0%	73,4%	2,3%	78,3%	2,3%	S8G5
20,8%	4,5%	5,8%	3,8%	1,0%	22,7%	41,3%	29,5%	8,4%	16B
19,0%	14,0%	8,3%	18,9%	0,7%	23,9%	15,2%	32,9%	32,9%	6A-1
18,0%	0,3%	10,1%	0,0%	0,0%	48,9%	22,7%	59,0%	0,3%	33B
16,7%	5,5%	14,8%	8,5%	1,7%	31,8%	21,0%	48,3%	13,9%	840
15,0%	1,0%	11,7%	2,1%	0,9%	62,3%	6,9%	74,9%	3,1%	28A
17,8%	18,5%	8,1%	20,5%	0,0%	22,1%	12,9%	30,2%	39,0%	43B
16,9%	0,0%	3,4%	2,7%	0,0%	61,2%	15,8%	64,6%	2,7%	1A-1
15,6%	2,7%	11,4%	10,9%	0,8%	53,7%	4,9%	65,9%	13,6%	U41-2
16,5%	0,7%	3,2%	3,9%	0,0%	68,4%	6,7%	72,2%	4,6%	56B
14,4%	0,9%	10,9%	2,5%	1,0%	66,4%	3,8%	78,3%	3,4%	46A
17,6%	0,0%	2,4%	3,3%	0,0%	66,3%	10,4%	68,7%	3,3%	15A-1
25,0%	0,0%	3,3%	0,0%	1,4%	53,2%	17,1%	57,9%	0,0%	13A
16,1%	13,4%	9,3%	13,6%	0,0%	32,3%	15,3%	41,6%	27,0%	37B
16,5%	9,1%	13,2%	6,7%	0,0%	38,9%	15,6%	52,1%	15,9%	43B
16,1%	12,4%	12,0%	15,7%	0,8%	30,5%	12,5%	43,3%	28,1%	17B
13,8%	0,8%	11,5%	2,8%	0,0%	67,0%	4,1%	78,6%	3,6%	27A
17,5%	18,6%	9,0%	19,5%	0,0%	21,7%	13,7%	30,7%	38,1%	46B
21,4%	1,4%	18,9%	0,0%	5,0%	43,5%	9,9%	67,3%	1,4%	ATCC20090
17,7%	0,0%	0,6%	4,4%	0,0%	68,2%	9,1%	68,8%	4,4%	5A
17,6%	16,0%	9,6%	18,8%	0,0%	25,6%	12,4%	35,2%	34,8%	28B-2
14,0%	0,9%	13,2%	1,6%	0,0%	64,7%	5,5%	77,9%	2,6%	27B
19,5%	2,9%	16,6%	1,1%	1,6%	30,2%	28,1%	48,5%	4,0%	49B
17,2%	0,7%	6,8%	2,7%	0,0%	63,0%	9,6%	69,8%	3,4%	19B
14,4%	3,5%	13,5%	26,0%	1,0%	37,2%	4,4%	51,6%	29,5%	549-2
16,1%	2,2%	15,7%	21,6%	0,0%	36,7%	7,8%	52,4%	23,7%	20B
17,3%	4,7%	14,3%	7,2%	2,9%	30,2%	23,5%	47,3%	11,9%	8B
11,5%	3,3%	11,3%	6,5%	1,1%	59,9%	6,5%	72,2%	9,8%	13B
16,6%	0,7%	10,7%	1,6%	0,0%	59,7%	10,8%	70,4%	2,2%	26A
16,1%	3,3%	13,5%	23,8%	0,0%	38,7%	4,7%	52,2%	27,1%	542
15,6%	0,6%	12,1%	0,0%	0,0%	60,2%	11,5%	72,3%	0,6%	35B
19,5%	0,0%	1,4%	3,4%	0,0%	66,6%	9,1%	68,0%	3,4%	42A
18,9%	3,5%	12,7%	25,0%	0,0%	35,0%	5,0%	47,6%	28-5%	40A
25,2%	3,3%	9,3%	21,8%	0,01	30,3%	10,1%	39,6%	25,1%	550C
11,6%	11,1%	13,2%	14,1%	1,3%	29,7%	14,0%	41,2%	25,2%	59A
19,9%	0,0%	5,5%	1,9%	0,0%	66,8%	6,0%	72,3%	1,9%	SBG9
15-4%	3,1%	13,2%	26,1%	0,0%	35,8%	6,5%	49,1%	29,1%	218
18,9%	0,7%	11,6%	0,0%	0,0%	59,1%	9,7%	70,7%	0,7%	28
14,1%	1,1%	12,4%	2,0%	0,0%	65,2%	5,2%	77,6%	3,1%	18
22,2%	16,2%	6,3%	17,7%	0,0%	16,1%	19,5%	24,4%	33,8%	558
16,0%	1,0%	4,5%	0,0%	0,0%	69,5%	9,0%	74,0%	1,0%	3A
17,0%	4,3%	12,4%	29,8%	0,0%	34,0%	2,5%	46,4%	34,1%	9B
15,4%	4,3%	8,7%	13,2%	0,0%	53,2%	5,1%	62,0%	17,5%	U24
14,2%	3,1%	12,0%	20,0%	1,1%	35,2%	14,3%	48,3%	23,2%	U28
16,8%	14,6%	10,1%	16,0%	0,6%	27,7%	14,0%	38,5%	30,7%	288-1
23,2%	1,9%	8,3%	1,1%	2,3%	22,7%	40,4%	33,3%	3,0%	448
24,6%	15,8%	8,7%	16,0%	0,0%	15,3%	19,6%	24,0%	31,8%	548
15,5%	0,0%	1,3%	2,9%	0,0%	72,7%	7,6%	74,0%	2,9%	55A
18,4%	1,0%	5,0%	3,0%	0,0%	66,2%	6,4%	71,3%	3,9%	49A
18,6%	15,3%	9,4%	18,0%	0,0%	27,3%	11,4%	36,7%	33,3%	51A
23,5%	13,1%	7,3%	17,9%	0,0%	26,7%	11,4%	34,0%	31,0%	14A-1
13,3%	1,1%	14,5%	8,9%	0,0%	64,6%	5,6%	79,1%	2,0%	25B
22,9%	2,4%	10,3%	21,5%	0,0%	26,5%	16,4%	36,9%	23,9%	41A
16,8%	1,0%	9,7%	2,7%	0,0%	58,3%	11,5%	68,0%	3,7%	24A
0,4%	8,5%	14,1%	10,2%	2,1%	27,6%	37,0%	43,8%	18,8%	61A
30,5%	0,0%	7,1%	0,0%	0,0%	0,6%	61,8%	7,7%	0,0%	BRBG
18,2%	14,9%	8,3%	18,7%	0,0%	24,4%	15,5%	32,7%	33,6%	17A
17,4%	2,0%	9,3%	2,8%	0,0%	55,7%	12,7%	65,0%	4,9%	60A
14,1%	0,8%	13,0%	1,2%	0,0%	67,8%	3,1%	80,8%	2,0%	26B

ES 2 199 946 T5

Tanto por ciento de ácidos grasos totales							Omega 3	Omega 6	Cepa
C16:0	C20:4w6	C20:5w3	C22:5w6	C22:5w3	C22:6w3	Otro FA	Totales	Totales	
17,8%	5,0%	6,9%	15,0%	1,5%	47,4%	6,4%	55,8%	20,0%	ATCC20888
16,0%	0,0%	1,8%	2,0%	0,0%	70,8%	9,4%	72,6%	2,0%	2A
24,6%	0,0%	4,0%	0,0%	0,0%	49,4%	22,0%	53,4%	0,0%	44A
17,4%	1,8%	0,0%	2,9%	0,0%	55,3%	23,3%	55,3%	4,6%	14A
23,3%	1,3%	4,6%	0,0%	0,0%	12,6%	58,1%	17,3%	1,3%	4B
19,3%	0,0%	1,1%	3,8%	0,0%	66,6%	9,1%	67,8%	3,8%	66A
18,6%	15,6%	8,3%	17,1%	1,1%	24,6%	14,8%	33,9%	32,7%	11A
19,6%	5,1%	10,11%	27,2%	0,0%	27,5%	10,6%	37,5%	32,3%	2%
15,7%	2,4%	14,0%	25,7%	0,0%	36,7%	5,4%	50,8%	28,1%	33A
14,6%	1,5%	13,5%	0,0%	0,0%	66,0%	4,3%	79,5%	1,5%	ATCC20892

Tanto por ciento de ácidos grasos totales							Omega 3	Omega 6	Cepa
C16:0	C20:4w6	C20:5w3	C22:5w6	C22:5w3	C22:6w3	Otro FA	Totales	Totales	
15,7%	3,9%	3,7%	8,1%	0,0%	55,1%	13,5%	58,8%	12,0%	ATCC34304
28,2%	1,6%	6,9%	11,4%	0,0%	17,8%	34,1%	24,7%	12,9%	ATCC24473
15,2%	2,9%	7,7%	9,8%	0,6%	54,6%	9,2%	62,9%	12,7%	ATCC28211
23,2%	10,7%	4,3%	12,6%	1,5%	20,6%	27,0%	26,4%	23,4%	ATCC28209
13,2%	6,3%	6,9%	4,3%	0,0%	60,1%	9,1%	67,0%	10,6%	ATCC29210

Tabla 3: Composición de la fracción de ácido graso Omega 3

EPA	OPA	DHA	Cepa	EPA	DPA	DHA	Cepa
C20:5w3	C22:5w3	C22:6w3		C20:5w3	C22:5w3	C22:6w3	
44,0%	1,1%	54,9%	21				
4,6%	0,9%	94,5%	ATCC20889	19,8%	5,8%	74,4%	18A
19,3%	0,7%	80,0%	U40-2	20,1%	0,7%	79,2%	32B
31,9%	0,0%	68,1%	21B	27,8%	0,0%	72,2%	56B
87,9%	0,0%	12,1%	BRBG1	24,1%	9,1%	66,9%	SX2
12,5%	6,1%	81,5%	56A	30,3%	6,9%	62,8%	53B
17,0%	3,7%	79,3%	11A-1	25,3%	2,5%	72,2%	S49
24,9%	4,3%	70,8%	4A-1	19,9%	3,8%	76,3%	S3
24,4%	8,4%	67,2%	17B	5,0%	0,0%	95,0%	3A-1
12,2%	1,5%	86,3%	ATCC20891	36,9%	2,6%	60,5%	15A
25,1%	1,7%	73,2%	S44	19,3%	0,0%	80,7%	9A-1
25,2%	1,1%	73,7%	U30	25,8%	4,4%	69,8%	51B
16,2%	5,4%	78,4%	59A	26,3%	5,0%	68,7%	8A-1
11,5%	1,4%	87,1%	U37-2	21,6%	6,7%	71,7%	13A-1
14,0%	1,9%	84,2%	S50W	28,0%	0,0%	72,0%	24B-2
12,7%	1,3%	86,0%	ATCC20891	28,7%	0,0%	71,3%	24B-1
---	---	---	UX	16,2%	0,0%	83,8%	3B
21,0%	2,9%	76,1%	LWN9	6,3%	0,0%	93,7%	SBG5
13,4%	1,0%	85,6%	C32-2	19,7%	3,3%	77,0%	16B
15,0%	4,3%	80,7%	5A-1	25,2%	2,1%	72,6%	6A-1
27,4%	5,4%	57,2%	BRBG1	17,1%	0,0%	82,9%	33B
17,0%	1,9%	81,1%	U3	30,5%	3,6%	65,9%	840
20,5%	1,3%	78,2%	55B	15,6%	1,2%	83,1%	28A
26,8%	0,0%	73,2%	43B	26,6%	0,0%	73,4%	40A
5,2%	0,0%	94,8%	1A-1	23,4%	0,0%	76,6%	S50C
17,4%	1,2%	81,5%	U41-2	30,6%	2,9%	66,4%	59A
5,4%	0,0%	94,6%	56B	7,6%	0,0%	92,4%	SBG9
13,9%	1,3%	84,8%	46A	27,0%	0,0%	73,0%	21B
3,5%	0,0%	96,5%	15A-1	16,4%	0,0%	83,6%	2B
5,8%	2,4%	91,8%	13A	15,9%	0,0%	84,1%	1B
22,3%	0,0%	77,7%	37B	25,9%	0,0%	74,1%	55B
25,4%	0,0%	74,6%	43B	6,0%	0,0%	94,0%	3A
27,7%	1,9%	70,3%	17B	26,7%	0,0%	73,3%	9B
14,7%	0,0%	85,3%	27A	14,1%	0,0%	85,9%	U24
29,2%	0,0%	70,8%	46B	24,9%	2,2%	72,9%	U28
28,0%	7,5%	64,5%	ATCC20890	26,4%	1,5%	72,1%	28B-1
0,9%	0,0%	99,1%	5A	24,8%	6,9%	68,3%	44B
27,3%	0,0%	72,7%	28B-2	36,4%	0,0%	63,6%	54B
16,9%	0,0%	83,1%	27B	1,8%	0,0%	98,2%	55A

EPA C20:5w3	OPA C22:5w3	DHA C22:6w3	Cepa	EPA C20:5w3	DPA C22:5w3	DHA C22:6w3	Cepa
34,3%	3,4%	62,3%	49B	7,1%	0,0%	92,9%	49A
9,7%	0,0%	90,3%	18B	25,6%	0,0%	74,4%	51A
26,1%	1,9%	71,9%	S49-2	21,5%	0,0%	78,5%	14A-1
29,9%	0,0%	70,1%	20B	18,4%	0,0%	81,6%	25B
30,1%	6,2%	63,7%	88	28,1%	0,0%	71,9%	41A
15,6%	1,5%	82,9%	13B	14,3%	0,0%	85,7%	24A
15,2%	0,0%	84,8%	26A	32,3%	4,8%	63,0%	61A
25,9%	0,0%	74,1%	S42	91,6%	0,0%	8,4%	BRBG
16,7%	0,0%	83,3%	35B				
2,1%	0,0%	97,9%	42A				

Tabla 3: Composición de la fracción de ácido graso Omega 3

EPA C20:5w3	DPA C22:5w3	DHA C22:6w3	Cepa
25,5%	0,0%	74,5%	17A
14,4%	0,0%	85,6%	60A
16,1%	0,0%	83,9%	26B
12,4%	2,7%	84,9%	ATCC20888
2,5%	0,0%	97,5%	2A
7,5%	0,0%	92,5%	44A
0,0%	0,0%	100,0%	14A
26,7%	0,0%	73,3%	41B
1,7%	0,0%	98,3%	66A
24,5%	3,1%	72,4%	11A
26,8%	0,0%	73,2%	2X
27,6%	0,0%	72,4%	33A
17,0%	0,0%	83,0%	ATCC20892

5

## Cepas anteriores

EPA C20:5w3	DPA C22:5w3	DHA C22:6w3	Strain
6,4%	0,0%	93,6%	ATCC34304
27,9%	0,0%	72,1%	ATCC24473
12,2%	1,0%	86,8%	ATCC28211
16,4%	5,6%	78,1%	ATCC28209
10,3%	0,0%	89,7%	ATCC28210

10

La Fig. 1 ilustra el conjunto de cepas, aisladas por el procedimiento del Ejemplo 1, que tienen más del 67% de ácidos grasos omega-3 (como % de ácidos grasos totales) y menos del 10,6% de ácidos grasos omega-6 (como % de ácidos grasos totales). Todas las cepas anteriormente conocidas tienen menos del 67% de ácidos grasos omega-3 (como % de ácidos grasos totales) y más del 10,6% de omega-6 (como % de ácidos grasos totales).

15

La Fig. 2 ilustra el conjunto de cepas, aisladas por el procedimiento del Ejemplo 1, que tienen más del 67% de ácidos grasos omega-3 (como % de ácidos grasos totales) y más del 7,5% de C20:5n-3 (como % de ácidos grasos totales). Todas las cepas anteriormente conocidas tienen menos del 67% de ácidos grasos omega-3 (como % de ácidos grasos totales) y menos del 7,8% de C20:5n-3 (como % de ácidos grasos totales).

20

### Ejemplo de referencia 5. Aumento de las velocidades de crecimiento de las cepas aisladas por el procedimiento del Ejemplo 1 comparadas con las cepas ATCC (cepas conocidas anteriormente)

25

Se seleccionaron células de *Schizochytrium* sp. S31 (ATCC nº 20888), *Schizochytrium* sp. S8 (ATCC nº 20889), *Thraustochytrium* sp. S42, *Thraustochytrium* sp. U42-2, *Thraustochytrium* sp. S42 y U30, (aislados todos por el procedimiento del Ejemplo 1) y *Thraustochytrium aureum* (ATCC nº 28211) y *Schizochytrium aggregatum* (ATCC nº 28209) (cepas anteriormente conocidas) procedentes del medio sólido F-1 y se colocaron en 50 ml de medio M-5.

30

Se ajustó el pH de la solución a 7,0 y se filtró la solución esterilizada. Después de tres días de cultivo en un agitador orbital (200 rpm, 27°C), se transfirieron 1 a 2 ml de cada cultivo a otro matraz de medio M-5 y se colocaron en el agitador durante 2 días. Los cultivos (1 a 2 ml) se transfirieron a continuación a otro matraz con medio M-5 y se colocaron en el agitador durante 1 día. Este procedimiento aseguró que todos los cultivos estaban en la fase exponencial de crecimiento. Estos últimos cultivos se utilizaron a continuación para inocular dos matraces de 250 ml con medio M-5 para cada cepa. Estos matraces se colocaron a continuación en agitadores a 25°C y a 30°C y se controlaron los cambios de su densidad óptica en un espectrofotómetro Beckman DB-G (660 nm, longitud de paso 1 cm). Se tomaron las lecturas de densidad óptica en los periodos siguientes: 0, 6, 10, 14, 17,25, 20,25 y 22,75 horas. Se calcularon a continuación los índices de crecimiento exponencial (duplicados/día) para los datos de

densidad óptica por el procedimiento de Sorokin (1973). Los resultados se presentan en la Tabla 4 y se ilustran (normalizados al crecimiento de la cepa U30 a 25°C) en la Fig. 4. Los datos indican que las cepas aisladas por el procedimiento del Ejemplo 1 tienen índices de crecimiento muy superiores a los de las cepas ATCC anteriormente conocidas tanto a 25°C como a 30°C, aún bajo las cantidades de fosfato optimizadas esenciales en el crecimiento continuo. Las cepas de Traustochytriales aisladas en las aguas antárticas frías no se ha demostrado que crezcan a 30°C.

**Tabla 4. Índice de crecimiento exponencial (duplicados/día)**

Cepa	25°C	30°C
S31* (ATCC nº 20888)	8,5	9,4
U40-2*	5,8	6,0
S8* (ATCC nº 20889)	7,1	8,8
S42*	6,6	8,3
U30*	5,5	7,3
28209**	4,6	5,0
28210**	3,5	4,5
28211**	4,2	5,7
34304**	2,7	3,7
24473**	4,6	5,3

\*cepa aislada por el procedimiento del Ejemplo 1

\*\*cepa ATCC previamente conocida

**Ejemplo de referencia 6. Aumento de las características de producción (crecimiento e inducción de lípidos) de las cepas aisladas por el procedimiento del Ejemplo 1 comparadas con las cepas ATCC (cepas conocidas anteriormente)**

Se seleccionaron células de *Schizochytrium* sp. S31 (ATCC nº 20888), *Schizochytrium* sp. S8 (ATCC nº 20889) (aislados ambas por el procedimiento del Ejemplo 1), *Thraustochytrium aureum* (ATCC nº 28211) y *Schizochytrium aggregatum* (ATCC nº 28209) (cepas de la técnica anterior) procedentes del medio sólido F-1 y se colocaron en 50 ml de medio M-5 (véase Ejemplo 3). Se ajustó el pH de la solución a 7,0 y se filtró la solución esterilizada. Después de tres días de cultivo en un agitador orbital (200 rpm, 27°C), se transfirieron 1 a 2 ml de cada cultivo a otro matraz de medio M-5 y se colocaron en el agitador durante 2 días. Se determinaron a continuación rápidamente los pesos en seco sin cenizas de cada uno de estos cultivos y a continuación se pipetearon 3,29 mg de cada cultivo en dos matraces erlenmeyer de 250 ml conteniendo 50 ml de medio M-5. Estos matraces se colocaron a continuación en un agitador rotatorio (200 rpm, 27°C). Después de 24 horas se centrifugaron a continuación porciones de 20 ml de cada cultivo, se descartaron los sobrenadantes y se transfirieron las células a matraces erlenmeyer de 250 ml conteniendo 50 ml de medio M-5 sin ningún glutamato (fuente de N). Se volvieron a colocar los matraces en el agitador y después de otras 12 horas se tomaron muestras para determinar los pesos en seco sin cenizas y cuantificar el contenido en ácido graso por el procedimiento de Lepage y Roy (1984). Los resultados se ilustran (normalizados a los rendimientos de ATCC nº 28211, cepa anteriormente conocida) en la Fig. 5. Los resultados indican que las cepas aisladas por el procedimiento del Ejemplo 1 produjeron 2 a 3 veces como mucho el peso en seco sin cenizas en el mismo periodo de tiempo, en una combinación de crecimiento exponencial y limitación de nitrógeno (para producción de lípido) como las cepas ATCC de la técnica anterior. Además, se obtuvieron rendimientos superiores de ácidos grasos totales y de ácidos grasos omega-3 de las cepas de la presente invención con cepas S31 (ATCC nº 20888) que producen 3 a 4 veces como mucho ácidos grasos omega-3 como las cepas ATCC de la técnica anterior.

**Ejemplo de referencia 7. Aumento de la tolerancia a la salinidad más baja y producción de ácido graso mediante cepas aisladas por el procedimiento del Ejemplo 1**

Las cepas de 4 especies de Traustochytridos, *Schizochytrium* sp. S31 (ATCC nº 20888), y *Thraustochytrium* sp. U42-2 (ATCC nº 20891) (aislados ambas por el procedimiento del Ejemplo 1) y *S. aggregatum* (ATCC 28209) y *T. aureum* (ATCC 28210) (obtenidos a partir de la *American Type Culture Collection*) se seleccionaron de entre el medio sólido F-1 y se incubaron durante 3 a 4 días a 27°C en un agitador rotatorio (200 rpm). Se preparó un intervalo de diferenciación de salinidad del medio haciendo las siguientes diluciones de las sales del medio M (NaCl, 25 g/l; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 5 g/l; KCl, 1 g/l; CaCl<sub>2</sub>, 200 mg/l: 1) 100% (p/v) sales del medio M en; 2) 80% (v/v) medio M, 20% (v/v) agua destilada; 3) 60% (v/v) medio M, 40% (v/v) agua destilada; 4) 40% (v/v) medio M, 60% (v/v) agua destilada; 5) 20% (v/v) medio M, 80% (v/v) agua destilada; 6) 15% (v/v) medio M, 85% (v/v) agua destilada; 7) 10% (v/v) medio M, 90% (v/v) agua destilada; 8) 7% (v/v) medio M, 93% (v/v) agua destilada; 9) 3% (v/v) medio M, 97% (v/v) agua destilada; 10) 1,5% (v/v) medio M, 98,5% (v/v) agua destilada. Se añadieron los siguientes nutrientes a los tratamientos (por litro): glucosa, 5 g; glutamato, 5 g; extracto de levadura, 1 g; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 200 mg; NaHCO<sub>3</sub>, 200 mg; metales PII, 5 ml; solución de vitaminas A, 1 ml y solución de antibióticos, 2 ml. Se inocularon cincuenta ml de cada uno de estos tratamientos con 1 ml de cultivo de las células en el medio F-1. Estos cultivos se colocaron en un

agitador orbital (200 rpm) y se mantuvieron a 27°C durante 48 h. Se recogieron las células por centrifugación y se determinaron los ácidos grasos totales por cromatografía de gases. Los resultados se ilustran en la Fig. 6. *Thraustochytrium* sp. U42-2 (ATCC nº 20891) aislada por el procedimiento del Ejemplo 1 puede rendir casi dos veces la cantidad de ácidos grasos producidos por *T. aureum* (ATCC 28211) y por encima de 8 veces la cantidad de ácidos grasos producida por *S. aggregatum* (ATCC 28209). Adicionalmente, U42-2 parece tener una tolerancia a la salinidad mayor en el extremo superior del intervalo de salinidad evaluado. *Schizochytrium* sp. S31 (ATCC nº 20888), aislado también por el procedimiento del Ejemplo 1, presentó tanto un alto rendimiento en ácido graso (2,5 a 10 veces el de las cepas ATCC anteriormente conocidas) como un intervalo mucho mayor de tolerancia a la salinidad que las cepas ATCC. Adicionalmente, *Schizochytrium* sp. S31 (ATCC nº 20888) se desarrolla mejor a muy bajas salinidades. Esta propiedad proporciona una fuerte ventaja económica al considerar la producción comercial, tanto debido a los efectos corrosivos de las aguas salinas sobre los reactores metálicos, como debido a los problemas relacionados con el vertido de las aguas salinas.

#### Ejemplo de referencia 8. Cultivo/Salinidad baja

Se inocularon cincuenta ml de medio de cultivo M/10-5 en un matraz erlenmeyer de 250 ml en una colonia de *Schizochytrium* sp. S31 (ATCC nº 20888) seleccionada de entre una diagonal en agar. El medio M/10-5 contiene: 1000 ml de agua desionizada, 2,5 g de NaCl, 0,5 de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,1 g de KCl, 0,02 g de CaCl<sub>2</sub>, 1,0 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,0 g de extracto de levadura, 5,0 g de glucosa, 5,0 g de ácido glutámico, 0,2 g de NaHCO<sub>3</sub>; 5 ml metales en trazas PII, 2 ml de mezclas de vitaminas y 2 ml de mezcla de antibióticos. El cultivo se incubó a 30°C en un agitador rotatorio (200 rpm). Después de 2 días el cultivo tenía una densidad moderada y estaba creciendo activamente. Se utilizó 20 ml de este cultivo creciendo activamente para inocular un fermentador de 2 litros conteniendo 1700 ml del mismo medio de cultivo excepto que la concentración de la glucosa y del glutamato se habían aumentado a 40 g/l (medio M/10-40). El fermentador se mantuvo a 30°C, con aireación a 1 vol/vol/min y mezclando a 300 rpm. Después de 48 h, la concentración de las células en el fermentador fue de 21,7 g/l. Las células se recogieron por centrifugación, se liofilizaron y se almacenaron en N<sub>2</sub>.

El contenido en ácido graso total y el contenido en ácido graso omega-3 se determinó por cromatografía de gases. El contenido en ácido graso total del producto final fue de 39,0% de peso en seco sin cenizas. El contenido en HUFA omega-3 (C20:5n-3, C22:5n-3 y C22:6n-3) del producto microbiano fue del 25,6% del contenido de ácido graso total. El contenido de cenizas de la muestra fue del 7,0%.

#### Ejemplo de referencia 9. Diversidad del contenido en ácido graso

El cultivo y el análisis cromatográfico de gases de la producción de ácidos grasos para varias cepas como las descritas en el Ejemplo 4 puso de manifiesto las diferencias en la diversidad de ácidos grasos. Las cepas de la presente invención sintetizaron menos ácidos grasos diferentes que las cepas disponibles anteriormente. La diversidad inferior de los ácidos grasos es una ventaja en la purificación del ácido graso ya que existen pocas impurezas para separar. Con fines de complemento alimenticio, menos ácidos grasos diferentes es ventajoso debido a que disminuye la probabilidad de ingerir ácidos grasos indeseables. La Tabla 5 muestra el número de HUFA diferentes presentes, en concentraciones mayores del 1% en peso de los ácidos grasos totales para cepas anteriormente conocidas, denominadas por el número ATCC y para cepas de la presente invención.

Tabla 5

Cepa	Nº de ácidos grasos diferentes en 1% ó % mayor de ácidos grasos totales
34304**	8
28211**	8
24473**	10
28209**	13
28210**	8
S31*	5
S8*	6
79B*	6

\* cepa aislada por el procedimiento del Ejemplo 1

\*\*cepa ATCC anteriormente conocida

#### Ejemplo de referencia 10. Recuperación

Se inocularon cincuenta ml de medios de cultivo M5 en un matraz erlenmeyer de 250 ml con una colonia de *Schizochytrium* sp. S31 (ATCC nº 20888) seleccionada de entre una diagonal en agar. El cultivo se incubó a 30°C en un agitador rotatorio (200 rpm). Después de 2 días el cultivo tenía una densidad moderada y estaba creciendo activamente. Se utilizó 20 ml de este cultivo creciendo activamente para inocular un fermentador de 1 litro conteniendo 1000 ml del mismo medio de cultivo excepto que la concentración de la glucosa y del glutamato se habían aumentado a 40 g/l (medio M/20). El fermentador se mantuvo a 30°C y pH 7,4, con aireación a 1 vol/min y

mezclando a 400 rpm. Después de 48 h, la concentración de las células en el fermentador fue de 18,5 g/l. La aireación y la mezcla en el fermentador se suspendió. A lo largo de 2 a 4 minutos, las células floclaron y sedimentaron en los 250 ml del fondo del sedimentador. Esta zona concentrada de células tiene una concentración de células de 72 g/l. Esta zona de células se puede sifonar desde el fermentador, y: (1) transferir a otro reactor durante un periodo de limitación de nitrógeno (p. ej.: mezclando la producción muy concentrada de varios fermentadores); ó (2) recoger directamente por centrifugación o filtración. Preconcentrando las células de esta manera, se ha de procesar del 60 al 80% menos de agua para recuperar las células.

**Ejemplo de referencia 11. Utilización de una variedad de fuentes de carbono y de nitrógeno**

Se inocularon cincuenta ml de medio de cultivo M5 en un matraz erlenmeyer de 250 ml con una colonia de *Schizochytrium* sp. S31 (ATCC nº 20888) o *Thraustochytrium* sp. U42-2 (ATCC nº 20891) seleccionada de entre una diagonal en agar. El medio M5 se describió en el Ejemplo 3 excepto para la adición de 2 ml de mezcla de vitaminas y 2 ml de mezclas de antibióticos. El cultivo se incubó a 30°C en un agitador rotatorio (200 rpm). Después de 2 días el cultivo tenía una densidad moderada y estaba desarrollándose activamente. Este cultivo se utilizó para inocular matraces de medio M5 con uno de los siguientes sustitutos de glucosa (a 5 g/l): dextrina, sorbitol, fructosa, lactosa, maltosa, sacarosa, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de patata, maíz molido; o uno de los siguientes sustitutos del glutamato (a 5 g/l): gelisato, peptona, triptona, caseína, licor de trigo macerado, urea, nitrato, amonio, suero o harina de gluten de maíz. Se incubaron los cultivos durante 48 horas en un agitador rotatorio (200 rpm, 27°C). Las densidades de cultivo relativas, que representan el crecimiento en los diferentes substratos orgánicos, se ilustran en las Tablas 6 y 7.

**Tabla 6. Utilización de fuentes de nitrógeno**

Fuente de nitrógeno	Cepas	
	<i>Thraustochytrium</i> sp. U42-2 ATCC nº 20891	<i>Schizochytrium</i> sp. S31 ATCC nº 20888
glutamato	+++	+++
gelisato	+++	+++
peptona	++	++
triptona	++	++
caseína	++	++
licor de trigo macerado	+++	+++
urea	+	++
nitrato	++	+++
amonio	+	+++
suero	+++	+++
harina de gluten de maíz	+++	+++

+++ = crecimiento elevado  
 ++= crecimiento medio  
 += crecimiento bajo  
 0= sin crecimiento

**Tabla 7. Utilización de fuentes de carbono orgánico**

Fuente de carbono	Cepas	
	<i>Thraustochytrium</i> sp. U42-2 ATCC nº 20891	<i>Schizochytrium</i> sp. S31 ATCC nº 20888
glucosa	+++	+++
dextrina	+++	+++
sorbitol	+	+
fructosa	+	+++
lactosa	+	+
maltosa	+++	+
sacarosa	+	+
almidón de maíz	+++	+
almidón de trigo	+++	+
almidón de patata	+++	+
maíz molido	+++	0

+++ = crecimiento elevado  
 ++= crecimiento medio  
 += crecimiento bajo  
 0= sin crecimiento

### Ejemplo de referencia 12. Alimentación de complemento alimenticio basado en Traustroquítrido a gambas de salmuera para aumentar su contenido en HUFA omega-3

Se produjo biomasa celular de *Thraustochytrium* sp. 12B (ATCC 20890) en matraces de agitación en medio M-5 (véase Ejemplo 3) a 25°C. Se produjo biomasa celular de *Thraustochytrium* sp. S31 (ATCC 20888) en matraces de agitación en medio M/10-5 (véase Ejemplo 8) a 27°C. Se recogieron las células de cada cepa por centrifugación. El precipitado se lavó una vez con agua destilada y se volvió a centrifugar para producir una pasta de sólidos del 50%. La pasta resultante se volvió a poner en suspensión en agua de mar y a continuación se añadió a un cultivo adulto de gambas de salmuera como complemento alimenticio. Las gambas de salmuera se han destacado anteriormente sobre los productos residuales agrícolas y como resultado su contenido en HUFA omega-3 fue muy bajo, solamente el 1,3 al 2,3% de los ácidos grasos totales (la gamba de salmuera pescada en su medio natural tiene un contenido medio en HUFA omega-3 del 6 al 8% total de ácidos grasos). Se mantuvieron gambas de salmuera (2 a 3 mg/ml) en un vaso de precipitados de 1 litro lleno con agua de mar y se utilizó una piedra porosa para airear la mezcla del cultivo. Después de la adición del complemento alimenticio, se recogieron muestras de gamba de salmuera periódicamente, se lavaron y se determinó su contenido en ácidos grasos por cromatografía de gases. Los resultados se ilustran en la Figs. 7 y 8. Cuando se alimenta el complemento alimenticio con traustroquítrido como alimento de acabado, el contenido en HUFA omega-3 de la gamba de salmuera se puede aumentar hasta el de la gamba de salmuera natural en 5 horas si se alimenta la cepa 12B o en 11 horas cuando se alimenta la cepa S31. El contenido en HUFA omega-3 de la gamba de salmuera se puede aumentar en gran medida por encima del de tipo natural si se alimentan estos complementos alimenticios durante hasta 24 horas. Adicionalmente, estos complementos alimenticios aumentan en gran medida el contenido de DHA de la gamba de salmuera, que se presenta generalmente sólo en concentraciones de trazas en la gamba de salmuera pescada en su medio natural.

### Ejemplo 13. Utilización de sulfato de sodio en medio de cultivo

Este ejemplo ilustra que la producción de omega-3 y el contenido total de ácidos grasos no perjudica y puede ser la misma o mejor al utilizar sulfato de sodio en lugar de cloruro de sodio como sal de sodio en un medio de fermentación.

Se cultivó *Schizochytrium* ATCC nº 20888 en un medio, pH 7,0, conteniendo 2,36 gramos de sodio por litro de medio, 1,5 a 3,0 gramos de una fuente de nitrógeno por litro de medio y 3,0 gramos de glucosa por litro de medio. Se incubaron las células a 28°C, a 200 rotaciones por minuto, durante 48 horas. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

#### Tabla 8. Efecto del sulfato de sodio comparado con el cloruro de sodio en el contenido en ácidos grasos

A) Sal de Na = cloruro de sodio; fuente de N = glutamato de sodio

Fuente de N (g/l)	Omega-3 (% peso en seco)	Ácidos grasos totales (% peso en seco)	Rendimiento en biomasa (g/l)
3,0	6,0	11,2	1,74
2,5	5,8	10,8	1,71
2,0	5,8	11,0	1,65
1,5	7,5	20,3	1,39

B) Sal de Na = cloruro de sodio; fuente de N = peptona

Fuente de N (g/l)	Omega-3 (% peso en seco)	Ácidos grasos totales (% peso en seco)	Rendimiento en biomasa (g/l)
3,0	7,9	21,9	1,34
2,5	9,4	27,4	1,21
2,0	6,7	28,9	1,18
1,5	11,1	42,1	1,16

C) Sal de Na = sulfato de sodio; fuente de N = glutamato de sodio

Fuente de N (g/l)	Omega-3 (% peso en seco)	Ácidos grasos totales (% peso en seco)	Rendimiento en biomasa (g/l)
3.0	9.3	31.9	1.34
2.5	10.1	38.6	1.35
2.0	10.1	41.4	1.30
1.5	9.5	43.6	1.26

Como se aprecia en la Tabla 8, la producción de omega-3 y de ácidos grasos totales cuando se utiliza sulfato de sodio es comparable a o mejor que cuando se utiliza cloruro de sodio como sal de sodio.



**Ejemplo de referencia 14. Producción de *Schizochytrium* en medio de cultivo de baja salinidad**

Este Ejemplo ilustra la fermentación de *Schizochytrium* en un medio de cultivo de baja salinidad mientras se mantienen rendimientos de biomasa elevados y producción elevada de omega-3 y ácidos grasos.

Se cultivó *Schizochytrium* ATCC nº 20888 en un medio, conteniendo 3,33 g/l de peptona como fuente de nitrógeno, 5,0 g/l de glucosa como fuente de carbono, con concentraciones de sodio variables. Las células se fermentaron a 30°C con un inóculo de aproximadamente 40 mg/l en peso en seco durante un periodo de 48 horas. Se aportó sodio como cloruro de sodio. Los resultados de esta prueba se muestran en la Tabla 9.

**Tabla 9. Producción de *Schizochytrium* en medio de cultivo de baja salinidad**

Conc. de Na g/l	Conc. de Cl g/l	Rendimiento en biomasa g/l	Ácidos grasos % peso en seco	Omega-3 % peso en seco	Glucosa final g/l
4,88	7,12	1,76 ± 0,60	35,4 ± 1,0	10,2 ± 0,6	0,00
3,90	5,70	1,72 ± 0,67	37,0 ± 0,7	11,1 ± 0,3	0,15
2,93	4,27	1,70 ± 0,42	43,0 ± 0,2	12,1 ± 0,1	0,22
1,95	2,85	1,66 ± 0,57	29,8 ± 0,7	9,3 ± 0,1	1,55
0,98	1,42	0,40 ± 0,61	10,6 ± 2,4	4,0 ± 1,0	4,31

Como se puede apreciar a partir de los resultados de la Tabla 9, los rendimientos elevados de biomasa y la producción de ácidos grasos omega-3 y de ácidos grasos totales se pueden conseguir a concentraciones de sodio mayores de aproximadamente 1,0 g/l.

**Ejemplo 15. Cultivo de *Schizochytrium* en un medio con bajo contenido en cloruro**

Este Ejemplo ilustra la fermentación de la microflora de la presente invención a concentraciones mínimas de cloruro aunque consiguiendo rendimientos elevados en biomasa en relación con la concentración de azúcar de partida.

Se cultivó *Schizochytrium* ATCC nº 20888 en matraces de agitación a 200 rpm y 28°C en alícuotas de 50 ml del medio siguiente: 1000 ml de agua desionizada; 1,2 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0,067 g de CaCO<sub>3</sub>; 3,0 g de glucosa; 3,0 g de glutamato monosódico; 0,2 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,4 g de extracto de levadura; 5,0 ml de metales PII; 1,0 ml de mezcla de vitaminas y 0,1 g de penicilina-G y 0,1 g de sulfato de estreptomina. La concentración de cloruro se varió añadiendo diferentes cantidades de KCl a cada tratamiento. La concentración de potasio en todos los tratamientos se mantuvo constante mediante adiciones de citrato de potasio. La concentración de sodio fue 2,37 g/l ó 4,0 g/l mediante adición de sulfato de sodio. Los resultados de estas fermentaciones se muestran a continuación en la Tabla 10.

**Tabla 10. Fermentación de *Schizochytrium* a concentraciones mínimas de cloruro**

Conc. de cloruro (mg/l)	Rendimiento en biomasa con 2,37 g/l de Na (mg/l)	Rendimiento en biomasa con 4,0 g/l de Na (mg/l)
0,1	198 ± 21	158 ± 48
7,1	545 ± 120	394 ± 151
15,1	975 ± 21	758 ± 163
30,1	1140 ± 99	930 ± 64
59,1	1713 ± 18	1650 ± 14
119,1	1863 ± 53	1663 ± 46
238,1	1913 ± 11	1643 ± 39
comparativa		

Como se puede apreciar a partir de los resultados mostrados en la Tabla 10, se pueden conseguir rendimientos elevados de biomasa para azúcar a baja concentraciones de cloruro. Por ejemplo, a una concentración de cloruro mayor de 59,1 mg/l, se pueden conseguir rendimientos mayores del 50%.

**Ejemplo 16. Variación de la concentración de sulfato de de sodio a concentraciones bajas de cloruro**

Este Ejemplo ilustra el efecto de la variación de la concentración de sulfato de sodio en una fermentación a baja concentración de cloruros.

Se cultivó *Schizochytrium* ATCC nº 20888 en matraces de agitación a 200 rpm y 28°C en alícuotas de 50 ml del medio siguiente: 1000 ml de agua desionizada; 1,2 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0,125 g de KCl; 0,067 g de CaCO<sub>3</sub>; 3,0 g de glucosa; 3,0 g de glutamato monosódico; 0,2 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,4 g de extracto de levadura; 5,0 ml de metales PII; 1,0 ml de mezcla de vitaminas; 0,1 g de penicilina-G y 0,1 g de sulfato de estreptomina. La concentración de

sulfato de sodio se varió en los tratamientos desde 3,0 g/l a 30,2 g/l. Los resultados de las pruebas de fermentación se muestran a continuación en la Tabla 11.

5

**Tabla 11. Variación de la concentración de sulfato de sodio a bajo contenido de cloruro**

<b>Sulfato de sodio (g/l)</b>	<b>Rendimiento en biomasa (g/l)</b>
3,0	0,78
6,0	1,13
9,1	1,72
12,1	1,88
15,1	1,89
22,7	1,91
30,2	1,63

Los resultados mostrados en la Tabla 11, ilustran que a una baja concentración de cloruros de aproximadamente 59 mg/l, se pueden obtener rendimientos elevados en biomasa de glucosa mayores del 50% mediante selección de una concentración apropiada de sulfato de sodio.

10

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento para el cultivo de *Thraustochytrium*, *Schizochytrium* y/o mezclas de las mismas, que comprende el cultivo de dichas *Thraustochytrium*, *Schizochytrium* y/o mezclas de las mismas, en un medio de cultivo que contiene sulfato de sodio y que presenta menos de 120 miligramos de cloruro por litro de dicho medio de cultivo.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende el cultivo de dichas *Thraustochytrium*, *Schizochytrium* y/o mezclas de las mismas, a una temperatura de 5°C a 48°C y a un pH de 5,0 a 11,0.
- 10 3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la concentración de dicho sulfato de sodio, expresada en gramos de sodio por litro de dicho medio de cultivo, es mayor de 1,0.
4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la concentración de dicho sulfato de sodio, expresada en gramos de sodio por litro de dicho medio de cultivo, está comprendida entre 1,0 y 50,0.
- 15 5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la concentración de dicho sulfato de sodio, expresada en gramos de sodio por litro de dicho medio de cultivo, está comprendida entre 2,0 y 25,0.
- 20 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dichas *Thraustochytrium*, *Schizochytrium* y/o mezclas de las mismas, poseen la totalidad de las características identificativas de un microorganismo biológicamente puro seleccionado de entre ATCC nº 20888 y nº 20889 y cepas mutantes procedentes de un microorganismo seleccionado de entre ATCC nº 20888 y nº 20889 y que presentan un contenido en ácido graso muy insaturado omega-3 de por lo menos el 0,5% en peso en seco.
- 25 7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dichas *Thraustochytrium*, *Schizochytrium* y/o mezclas de las mismas, poseen un contenido en esterol de por lo menos el 0,1% en peso en seco sin cenizas.
- 30 8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que *Thraustochytrium*, *Schizochytrium* y/o mezclas de las mismas, poseen un contenido en colesterol de por lo menos 15% del contenido total de esterol.
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dichas *Thraustochytrium*, *Schizochytrium* y/o mezclas de las mismas, poseen un tamaño del agregado celular menor de 150 µ (150 micras) de diámetro.
- 35 10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dichas *Thraustochytrium*, *Schizochytrium* y/o mezclas de las mismas, poseen un tamaño del agregado celular menor de 100 µ (100 micras) de diámetro.
- 40 11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dichas *Thraustochytrium*, *Schizochytrium* y/o mezclas de las mismas, poseen un tamaño del agregado celular menor de 50 µ (50 micras) de diámetro.

FIG.1

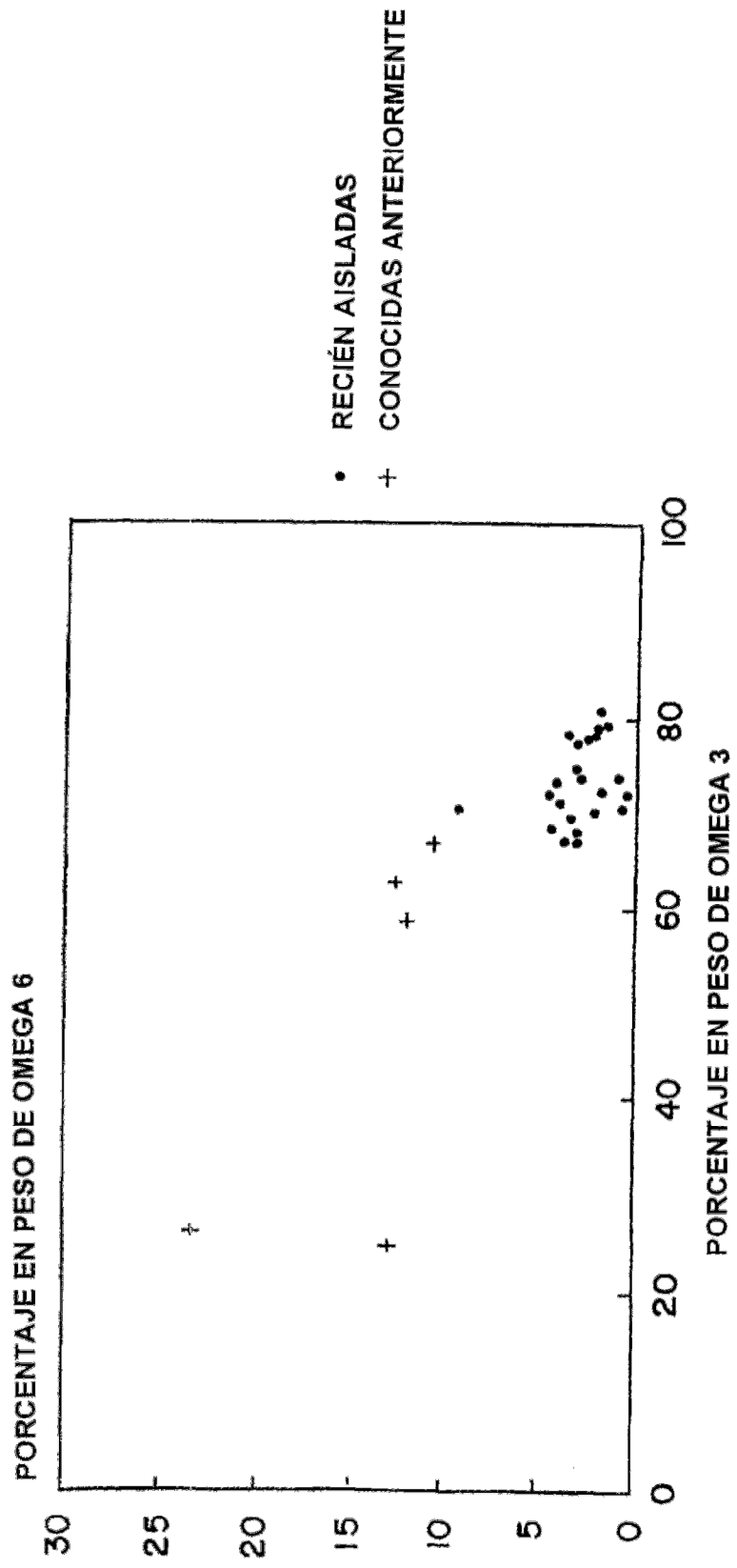


FIG. 2

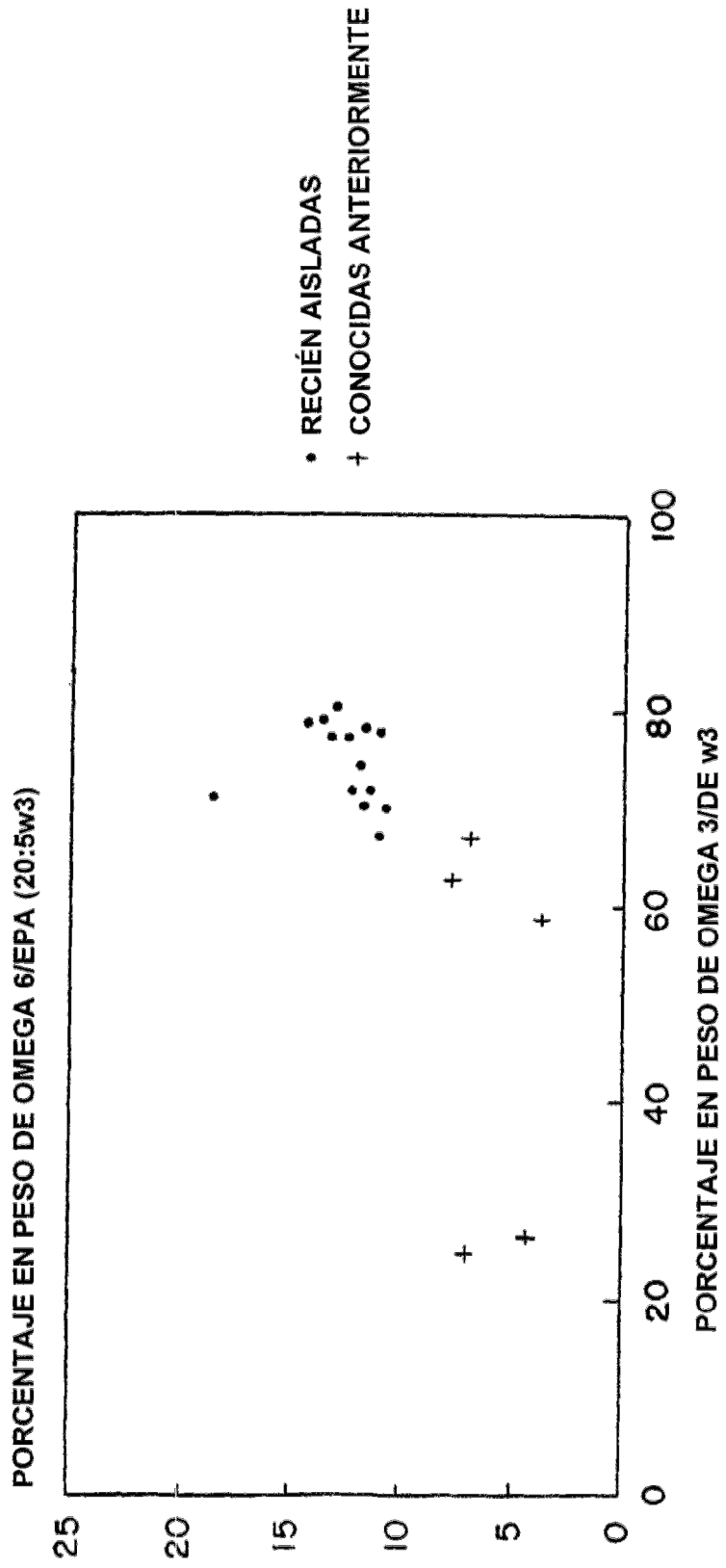


FIG. 3

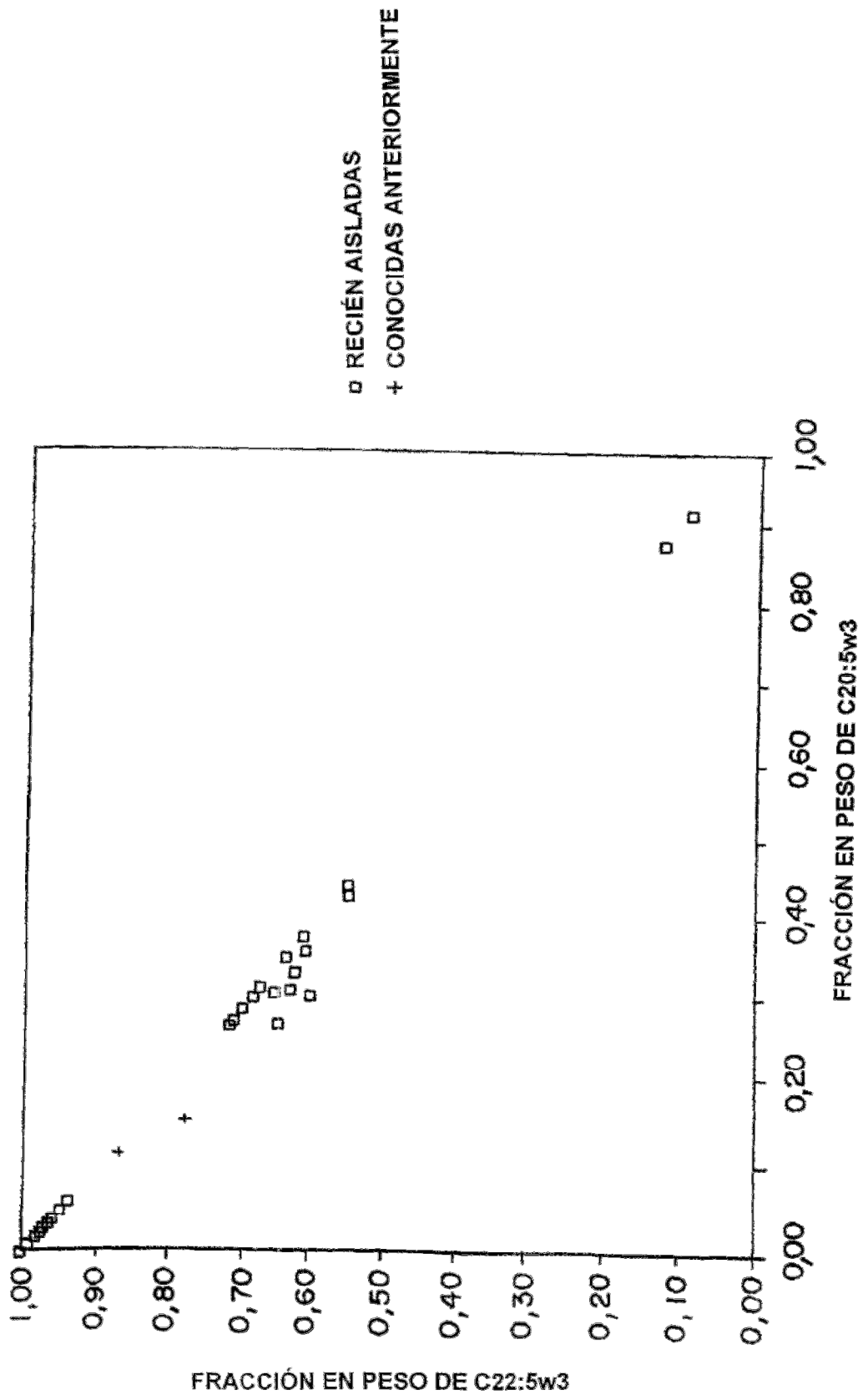


FIG. 4

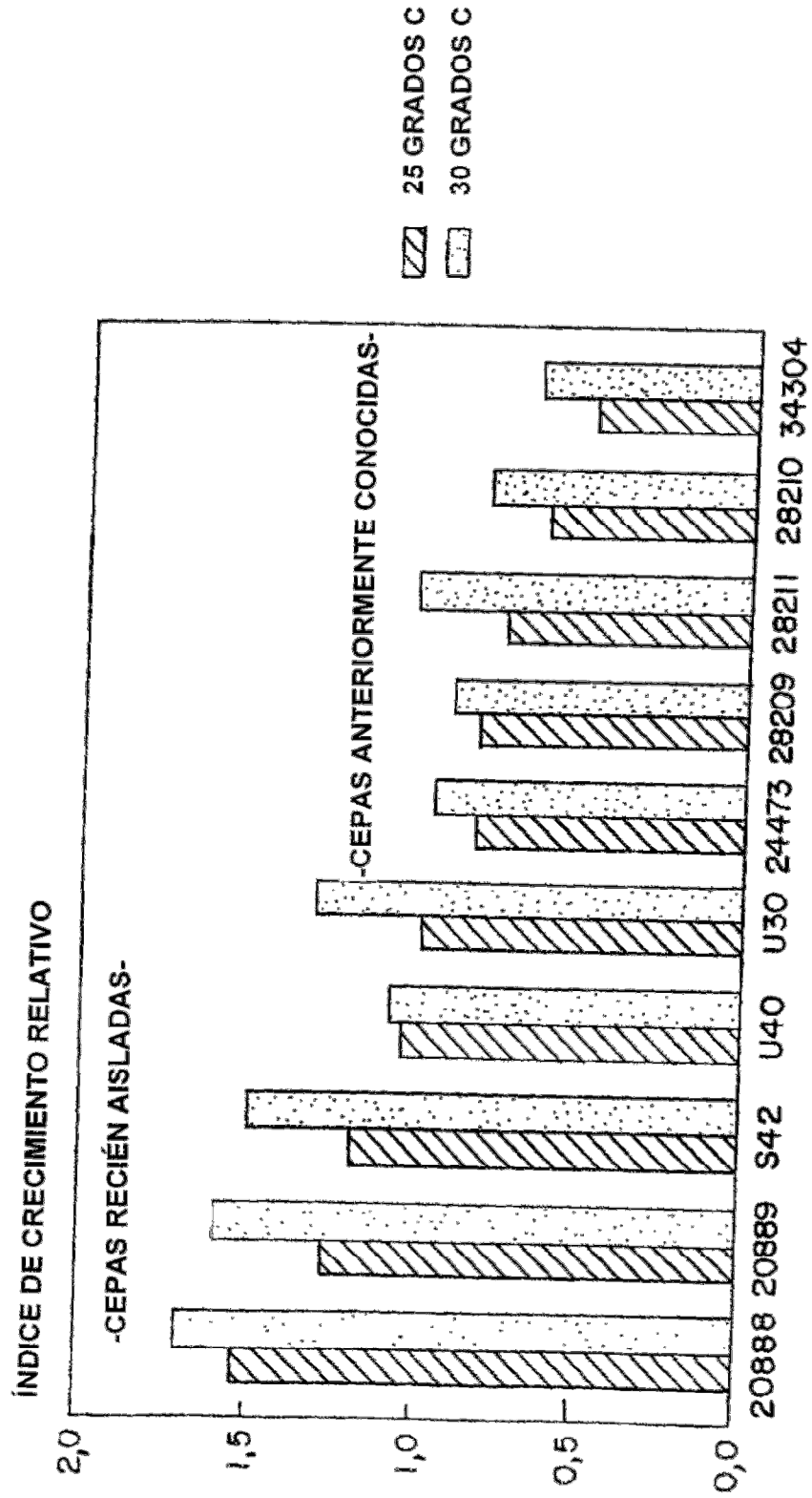


FIG. 5

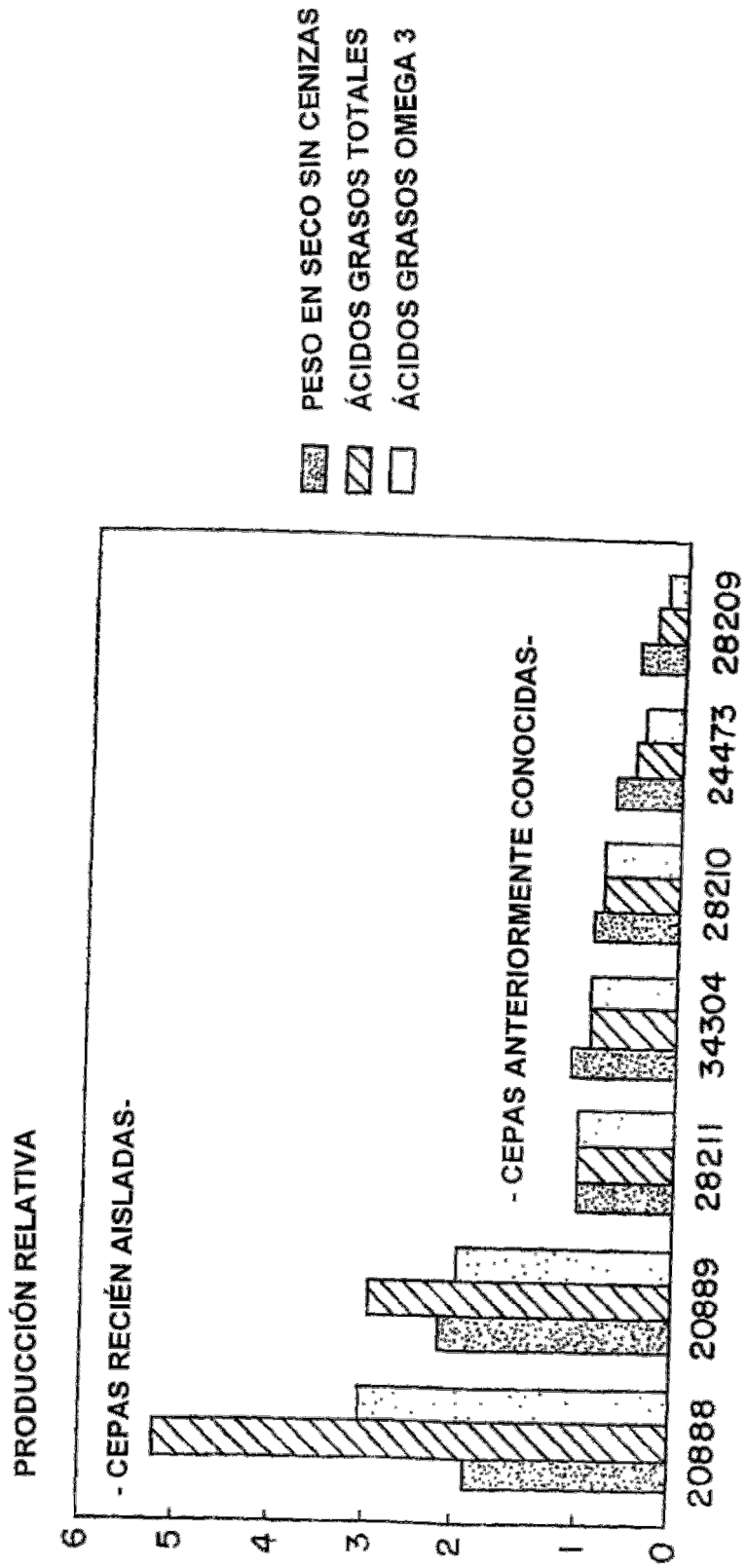




FIG.6

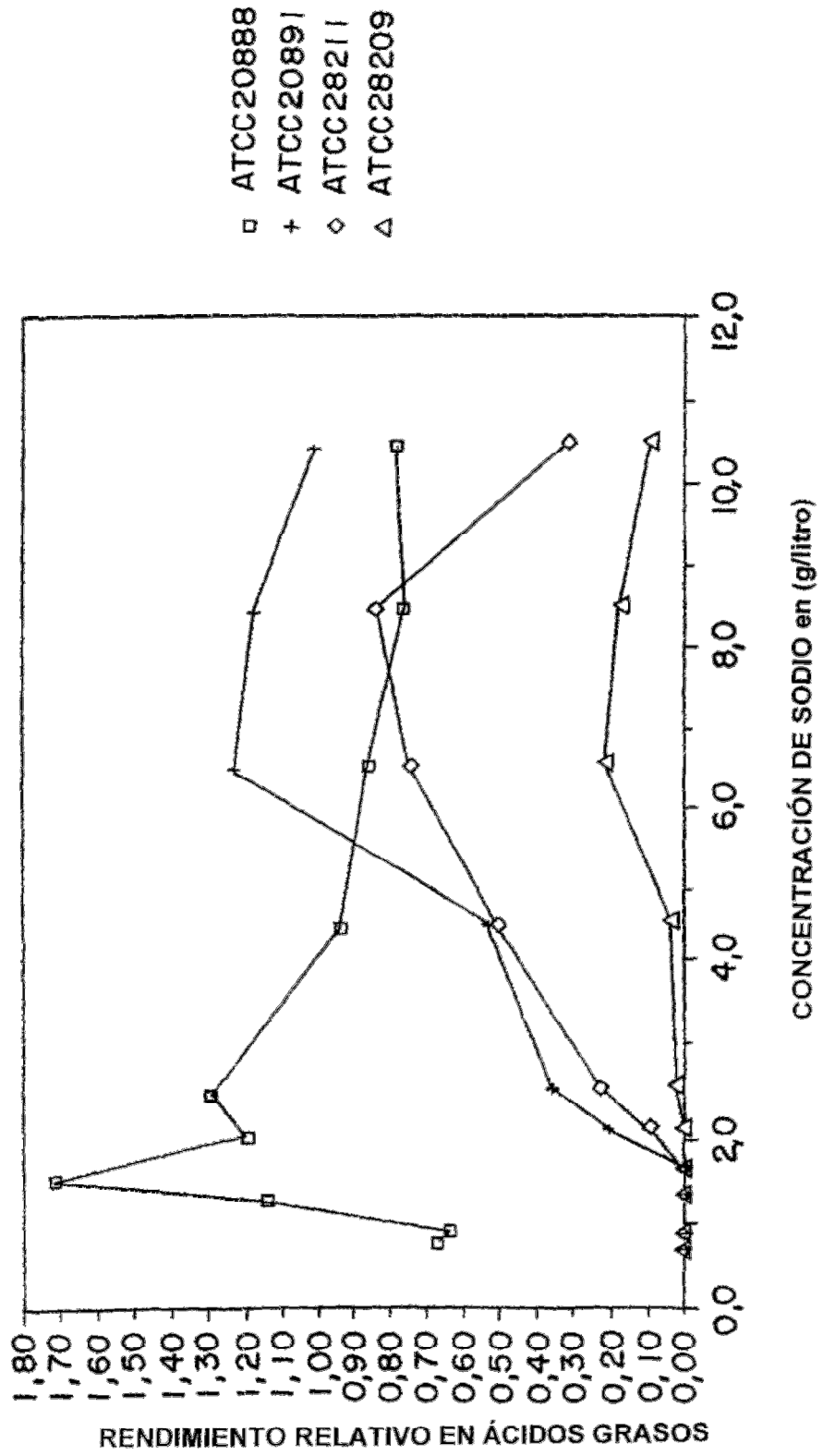


FIG. 7

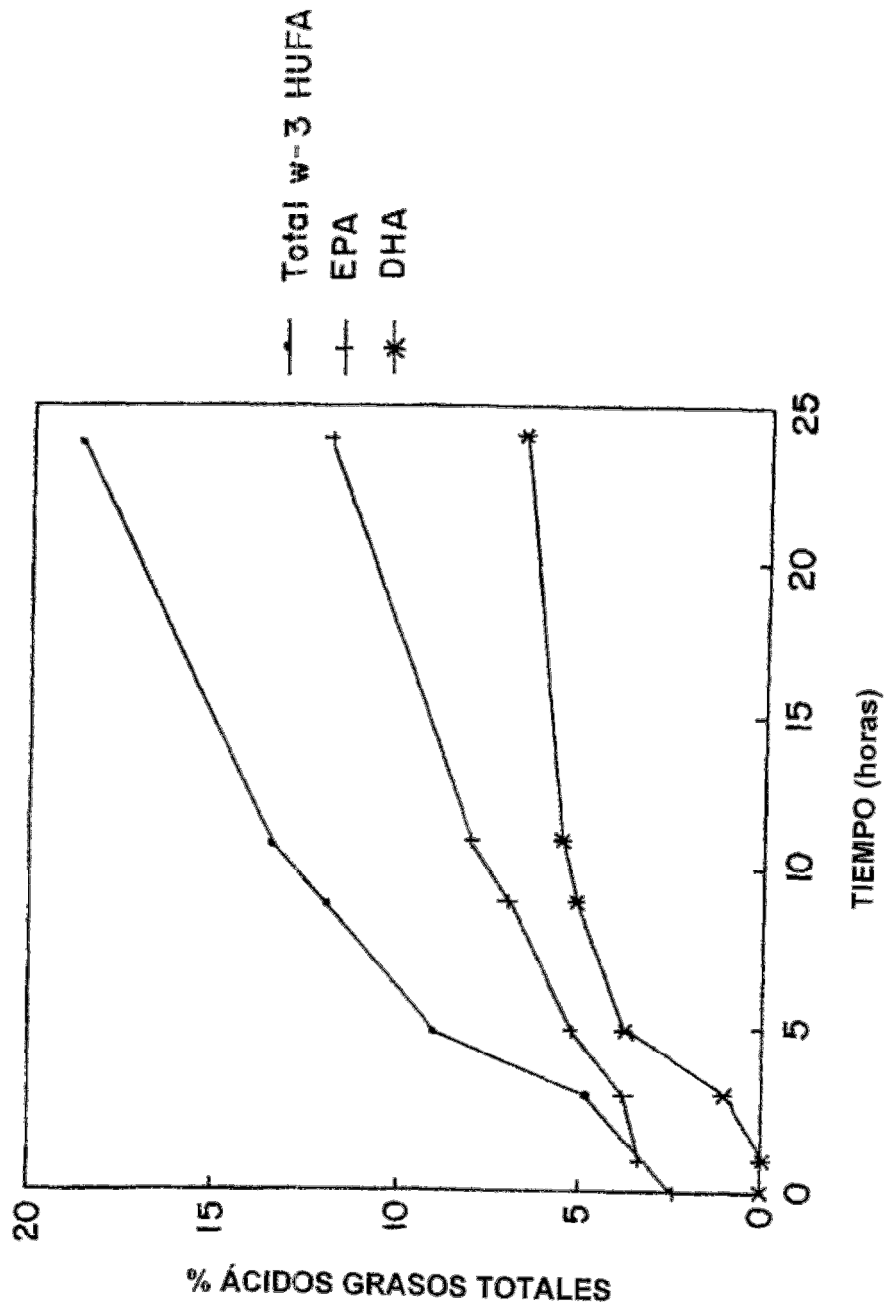


FIG. 8

